エイズ/HIV 感染症

目次

1. はじめに
2. 検査手順
   - 2.1. HIV スクリーニング検査
   - 2.2. 追加スクリーニング検査（追加検査）
   - 2.3. 確認検査
   - 2.4. HIV-2 の検査
   - 2.5. BED アッセイ
3. 病原体の検出法
   - 3.1 ウイルス分離法（通常PBMC共培養法）
   - 3.2 PBMC共培養によるHIV高効率分離法
   - 3.3 MAGIC-5A細胞と磁気粒子によるHIV分離法
4. HIV ゲノムの増幅とサブタイプ・サブタイプ間組換体判定法
   - 4.1. ゲノムの増幅とダイレクトシークエンス法による塩基配列の決定
   - 4.2. 系統樹の作成とサブタイプ間組換え構造の解析
   - 4.3. HIV-2 ゲノムの検出とグループの同定
5. HIV-1 RNA 定量法（KK-TaqMan 法）
6. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法
7. 執筆者一覧および連絡先

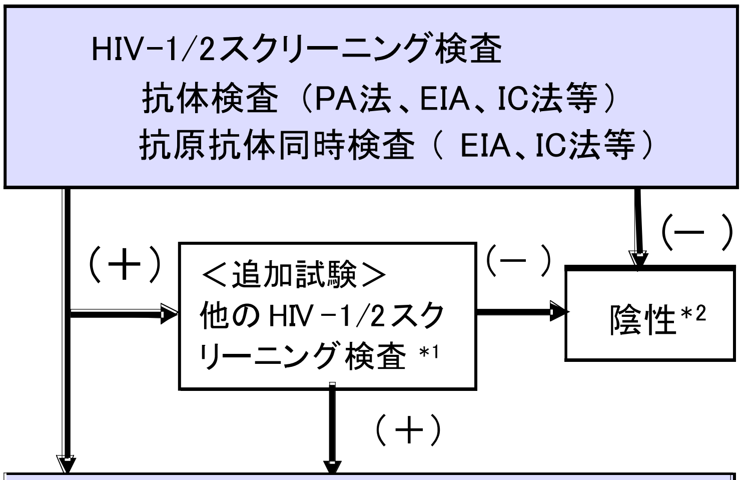
１．はじめに

後天性免疫不全症候群（AIDS）は Human Immunodeficiency Virus（HIV：ヒト免疫不全ウイルス）を病原体とする致死性の慢性持続性感染症である。1981 年に最初の AIDS 症例が報告されて以来、その流行は全世界に波及し、流行開始以来の累積感染者数は 6,000 万人以上に達するものと推定されている。HIV の感染経路は主として 1）感染者との性的接触、2）HIV 汚染血液との接触、3）母子感染である。日本では性的接触による感染が最も多く、全体の約 80％を占めている。HIV に感染すると通常、数年から十年の無症候期を経て AIDS を発症し、治療を行わないと数年で死に至るが、有効な治療法（highly-active antiretroviral therapy :HAART）が開発され、適切な時期に治療を開始することで、患者の予後は著しく改善した。しかし、一方で AIDS を発症して初めて感染に気づく例が増えており、治療を困難にしている。

HIV 感染の早期発見は患者の治療および流行の拡大を防ぐために極めて重要である。我が国では 1987 年から全国の保健所において匿名 HIV 抗体検査が始まり、1993 年からは検査が無料化され、その後の特設検査所の開設、即日検査、土日検査、夜間受付け等の導入により広く国民に HIV 検査の機会が提供されている。

本マニュアルでは主に保健所等の無料匿名検査に連なる地方衛生研究所における HIV 検査手順、検査法の概要を示すとともに、感染時期推定の方法としての BED アッセイなどに触れた。病原体診断法としてはウイルス分離培養、ウイルス遺伝子検出法、組換え体判定法などの解析法とともに進展著しい薬剤耐性遺伝子検査法について記載した。

図１　HIV 検査実施フローチャート



HIV確認検査

WB法	核酸増幅検査	判定
＋	（＋, － ）	感染
±	＋	感染
	－	陰性 *3
－	＋	感染 *4
	－	陰性 *2

*1　一回目のスクリーニング検査 より感度の高い検査法を使用する。
*2　感染初期の可能性が考えられる場合は、数週間後に採血し、
　　再検査を実施する。
*3　感染の疑いがある場合は、数週間後に採血し、再検査を実施する。
*4　WB法が陽性となるまでフォローアップすることが望ましい。

２．HIV 検査の検査手順

２−１．HIV スクリーニング検査

HIV 検査はスクリーニング検査と確認検査の 2 段階で行われる（図 1)。スクリーニング検査には抗体検出法として凝集法（PA 法）、酵素免疫抗体法（EIA)、イムノクロマトグラフィー法（IC 法）があり、いずれも HIV-1/2 抗体の両方が検出できる。抗原・抗体同時検査法のほとんどは EIA であり、HIV-1/2 抗体に加えて HIV-1 抗原を検出でき、抗体のみの検査に比べウインドウ期を短縮することができる。

現在、体外診断法として認可、販売（2012 年 3 月現在）されている HIV スクリーニング検査診断薬を表 1 に示した。承認された検査診断薬は一定の感度・正確性を有しており、検査診断薬の選択は各施設の判断によるが、使用キットの特徴を理解し、使用することが必要である。ほとんどの HIV-1/2 抗体検出診断薬では、多様な HIV-1/2 で比較的抗原決定基が保存されている膜貫通部位（HIV-1 gp41, HIV-2 gp36）の組換え蛋白あるいは合成ペプチドを抗原に用いて HIV-1 及び HIV-2 に対する抗体を検出している。

第３世代の抗体検出系としては複数の体外診断薬があり、これらは抗 HIV-1/2 抗体を迅速・簡便検出系より高い感度で検出するが、その多くは高価な専用自動免疫測定機器が必要である。用手法で使えるジェネディア HIV-1/2 ミックス PA は、その簡便さと抗体価が得られることから地方衛生研究所等では現在でも頻用されている。迅速検査 IC 法で現在、最も使用されているのは抗体検出法のダイナスクリーン HIV-1/2 であるが、2010 年末より抗原・抗体同時検出法のエスプライン HIV Ag/Ab が使用可能となった。

HIV 感染症では感染後、抗体が検出されるまでのウインドウ期は通常 1 〜3 ヶ月間である。第 4 世代の抗原・抗体同時検出系では第３世代の抗体検出系に比べ 5〜7 日程度ウインドウ期を短縮することが出来る。ウイルスのコア抗原（HIV-1 p24 gag）と抗体を同時に検出する第 4 世代抗原・抗体同時検出系は 2000 年頃から開発され、現在では抗原検出感度をより高めた改良型第４世代体外診断薬が複数認可、市販されている。感染診断のスクリーニング検査においては急性感染期の検出漏れがないよう、この第 4 世代抗原・抗体同時検出系が推奨されている。しかしながらその多くは化学発光測定と組み合わせて高感度に検出するため高価な専用自動免疫測定機器が必要であり、診断会社や拠点病院などでよく使用されている。一方、EIA 原理で用手法でもできるジェンスクリーン　HIV Ag-Ab ULT は ELISA リーダーなど汎用機器があれば使用でき、感度・正確性も劣ってはいないが、他の自動免疫測定機器専用診断薬より判定に時間がかかる。第 4 世代抗原・抗体同時検出系が陽性の場合は、抗原か抗体かいずれかが陽性か区別が付かないため、確認検査のＷＢが陰性でも必ず遺伝子検査が必要となる。

抗原検出系の診断薬は、感染初期において抗原が検出できる時期が限られることから現在では診断検査に用いられないが、感染者のフォローアップやウイルス分離の確認に用いることができる。

HIV 感染診断薬に限らず診断薬は高い感度と正確性が求められるが、感度と正確性は相互に

二律背反な因子である。スクリーニング検査用の HIV 感染診断薬は、その目的から感染検体を漏らさず検出することが求められる。それゆえ偽陽性が避けられないこと（試薬により 0.2%～0.5%程度）を常に念頭に置く必要がある。この比較的多い偽陽性検体を除外するためには、確認検査の前に最初のスクリーニング検査より感度の高い別の診断薬で追加検査を実施することが有効である。

２-２．追加スクリーニング検査（追加検査）

スクリーニング検査では、感染初期のウインドウ期間内にある場合を除き、HIV 感染者は陽性となるが、検査法により 0.3%～1%程度の偽陽性が認められる。一方、保健所等の検査における確認検査後の HIV 陽性率は平均で約 0.3%（2010 年）であり、EIA や PA 法の偽陽性率とほぼ同じである。比較的多く出現する偽陽性を除外するためには、確認検査の前に追加検査を実施することが有効である。追加検査を行う際に重要なことは、最初のスクリーニング検査法より感度の高いキットを使用することである（表２）。

表 2　1 次スクリーニング検査法と追加検査法の組み合わせ

1 次スクリーニング検査法	追加検査法
抗体検査法（PA 法、EIA 等）	抗原抗体同時検査法（EIA 等）
抗体検査法（IC 法）	抗体検査法（PA 法、EIA 等）、or 抗原抗体同時検査（EIA 等）
抗原抗体同時検査法（IC 法）	抗原抗体同時検査法（EIA 等）

表１　日本で認可販売されている **HIV** 検査試薬（**2011** 年 **12** 月現在）

検査法		キット名	メーカー名	測定方法
抗体検査 （HIV-1/2抗体）	スクリーニング検査	ダイナスクリーン・ HIV-1/2	アリーアメディカル	イムノクロマトグラフィー（IC法）
		ジェネディア HIV-1/2ミックスPA	富士レビオ	凝集法（PA）
		ルミパルス　オーソ HIV-1/2	富士レビオ	CLIA
		ルミパルスプレスト　オーソ HIV-1/2	富士レビオ	CLIA
		ケミルミ　Centaur HIV-1,2抗体	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス	CLIA
		ピトロス HIV-1/2抗体	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス	CLIA
		ランリームHIV-1/2	シスメックス	ラッテクス凝集法
		HISCL HIV Ab試薬	シスメックス	CLIA
	HIV-1/2鑑別法	セロディアHIV-1/2	富士レビオ	凝集法（PA）
		ペプチラブ１，２	バイオ・ラッド・ジャパン	ラインブロット法
	確認検査	ラブブロット1	バイオ・ラッド・ジャパン	ウェスタンブロット法（WB）
		ラブブロット2	バイオ・ラッド・ジャパン	ウェスタンブロット法（WB）
抗原抗体同時検査 （HIV-1/2抗体、HIV-1抗原）	スクリーニング検査	アキシムHIV　Ag/Ab コンボアッセイ・ダイナパック	アボット・ジャパン	FLIA
		アーキテクト・ HIV Ag/Abコンボアッセイ	アボット・ジャパン	CLIA
		ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT	バイオ・ラッド・ジャパン	ELISA
		エンザイグノスト HIV インテグラル	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス	ELISA
		バイダスアッセイキット HIV DUOII	シスメックス・ビオメリュー	ELFA
		エクルーシス試薬 HIV combi	ロシュ・ダイアグノスティックス	ECLIA
		HISCL HIV Ag + Ab試薬	シスメックス	CLIA
		ルミパルス HIV Ag/Ab	富士レビオ	CLIA
		ルミパルスプレスト HIV Ag/Ab	富士レビオ	CLIA
		エスプライン HIV Ag/Ab	富士レビオ	イムノクロマトグラフィー（IC法）
抗原検査 （HIV-1抗原）	スクリーニング検査	ルミパルスＩ　HIV-1 P24	富士レビオ	CLIA
核酸増幅検査 （HIV-1 RNA）	確認検査	コバスTaqMan HIV-1「オート」 v.2.0	ロシュ・ダイアグノスティックス	リアルタイムRT-PCR
		アキュジーン m-HIV-1	アボット・ジャパン	リアルタイムRT-PCR

２-３．確認検査

スクリーニング検査が陽性の場合は確認検査を行う。

抗体確認検査としてウエスタン・ブロット法（WB 法）を行い、典型的な陽性パターンを示す場合は HIV 感染と判定する。判定保留、または陰性であっても感染初期が疑われる場合は核酸増幅検査（NAT）を行い、感染初期か否かを確認する。感染初期で抗体が弱陽性のケースや抗体の陽転前で抗原陽性のケースでは WB 法で判定ができないため、NAT を行う。

確認検査は、その目的から感度よりも正確性が求められる。現在、抗体検出による HIV-1/2 鑑別系と HIV-1 ウイルス遺伝子定量の核酸増幅定量測定系がある。しかしながら抗体検出による HIV-1/2 鑑別系のウェスタン・ブロット法とライン・ブロット法は、スクリーニング検査用診断薬より感度が数段劣る。またウェスタン・ブロット法では HIV-1 と HIV-2 との間にウイルス構成蛋白抗原（p24 gag, pol、env 関連抗原など）に少なからず交差反応が認められる場合があることが知られている。これらの要因によりウェスタン・ブロット法の結果の解釈には経験が必要とされる。従来、第３世代抗体検出系でスクリーニングした陽性検体は抗体検出系の HIV-1 と HIV-2 のウェスタン・ブロット法で確認していたが、第４世代抗原・抗体同時検出系でスクリーニングした陽性検体は、急性感染期など充分な抗体がない場合、抗体検出系で感度が劣るウェスタン・ブロット法ではその多くが陰性か判定保留となる。それゆえ第３世代抗体検出系のジェネディア HIV-1/2 ミックス PA で抗体価が低い場合、あるいは第３世代抗体検出系および第４世代抗原・抗体同時検出系でカットオフ・インデックス（COI）値が低い場合は充分な特異抗体がない場合が多いので、感度に劣るウェスタン・ブロット法では陰性か判定保留となる可能性が高いことを考慮すべきである。また現在の第４世代抗原・抗体同時検出系での抗原検出感度は p24 gag 抗原が約 10 pg/ml で、COI 値が１以上で陽性と判定する。今後 HIV-1/2 の血清学的確認検査で、ウェスタン・ブロット法に関する解釈の煩雑さを低減するような新たな試薬の導入が望まれる。いずれにせよ感染診断に用いている試薬の特性を把握することが重要であり、操作は煩雑になるが病原体検査の基本となるウイルス分離がウイルスの特性解析には望まれる。

現在、体外診断薬として認可・販売されている HIV 遺伝子検査法は、表１に示した２種類であり、２法とも HIV-1 検出系であり HIV-2 は検出できない。HIV-1 ではそれぞれ標的遺伝子領域が異なる。核酸増幅定量測定系は急性感染期と感染母体からの新生児の感染診断に必須である。しかしながら各検査法はそれぞれに高価な専用装置が必要であるため、多くの施設においては導入が難しいと思われる。そのため、本マニュアルでは HIV 検査体制研究班（厚生労働科学研究補助金エイズ対策研究事業）で開発した汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1RNA 定量法である KK-TaqMan 法を別項で記載した。

２-４．HIV-2 の検査

HIV-2 は主に西アフリカで流行しているが、日本国内で報告された HIV-2 感染例は 10 例程度

で、HIV-1 と HIV-2 の重複感染例は報告されていない（2012 年 3 月現在)。

1）HIV スクリーニング検査陽性、確認検査で HIV-1 陰性の場合

HIV-2 感染の可能性を考慮し、HIV-2 の確認検査を行う。HIV-2 の WB 法で陽性であれば HIV-2 感染、陰性であれば HIV-2 感染は否定できる。しかし、HIV-2WB 法で判定保留の場合には、HIV-1 と HIV-2 の鑑別検査法　セロディア HIV-1/2、あるいはペプチラブ 1, 2 を用いて HIV-2 感染の有無を確認する。または最初のスクリーニング検査法とは異なるスクリーニング検査で再検査（追加検査）を行い、陰性であれば HIV-2 の感染は否定できる。すなわち、追加スクリーニング検査を実施することで、HIV-2 の偽陽性の多くは除外することができる。

鑑別検査で HIV-2 陽性の場合や、陰性ではあるが HIV-2 の感染初期が疑われる場合は、HIV-2 遺伝子検査を実施することが望ましい。しかし、HIV-2 の遺伝子検査はいくつか報告されているが、HIV-2 感染の有無を確認するための方法として十分なバリデーションがなされていない。したがって、上記の例では、一定期間後（2 週間以上）の再検査を勧め、HIV-2 抗体価の上昇が認められれば HIV-2 陽性と判定する。

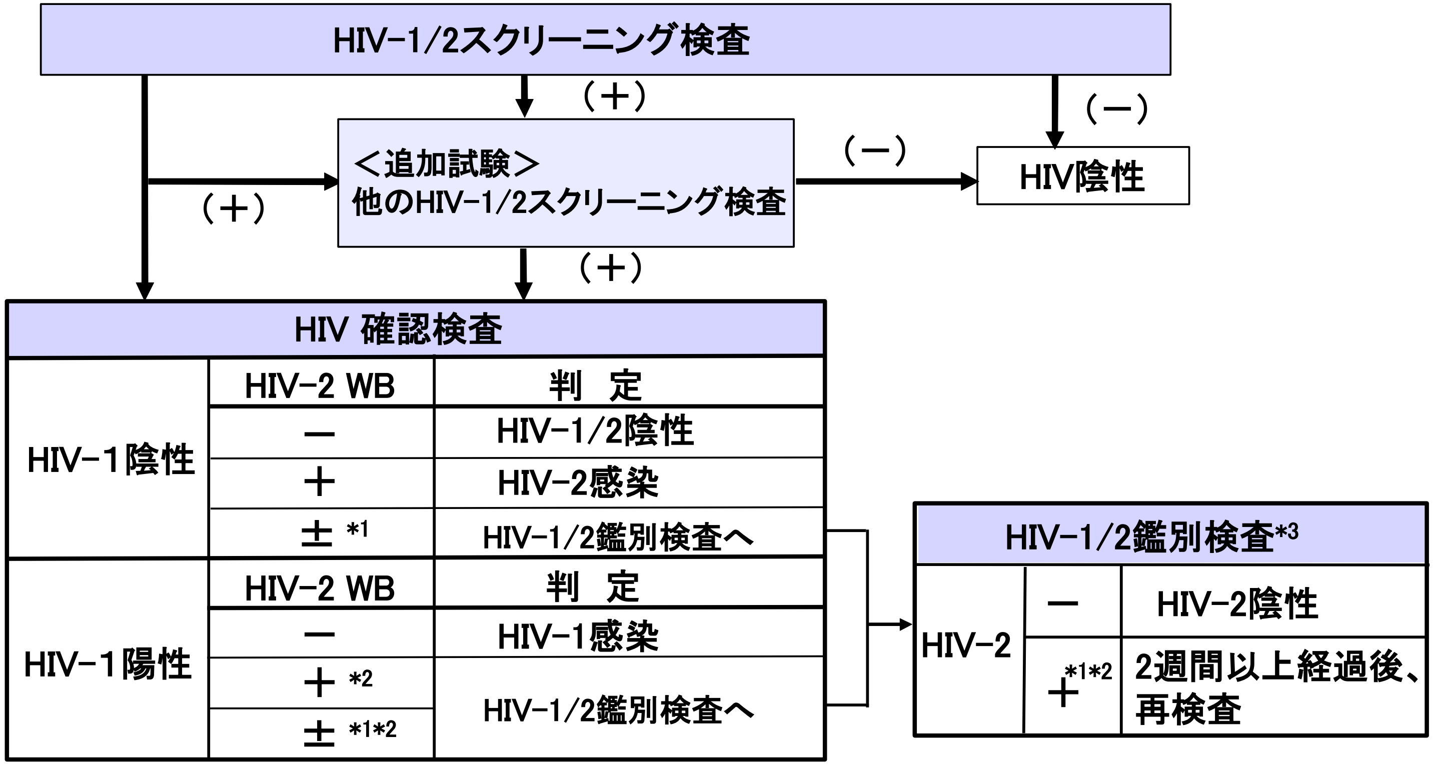
2）HIV-1 の確認検査が陽性で、HIV-2 の WB 法で判定保留の場合

HIV-1/2 鑑別検査法で HIV-2 が陰性であれば HIV-2 の WB 法の反応は HIV-1 の交差反応と考えられ、HIV-2 は陰性と判定できる。

一つのオプションとして確認検査を実施する前に HIV-1/2 鑑別検査を行うことも可能である。HIV-1 陽性者の中には HIV-2 抗原と強い交差反応を示し、WB 法では判定が難しいケースがあるが、確認検査実施前に鑑別検査を行うことによって、このような交差反応の多くを除外することができる。

しかし、HIV-1 陽性の中には HIV-2WB 法および 2 種類の HIV-1/2 鑑別検査法とも交差反応を示すケースが稀ではあるが存在する。HIV-1/2 の重複感染の判定は慎重を要するため、判定の難しい場合は著者らにご連絡いただきたい。

図2 HIV-2検査実施フローチャート



*1　HIV-2の感染初期が疑われる場合は、2週間以上経過後、再検査を行う。

*2　HIV-1陽性の場合、交差反応によってHIV-2陽性または保留となることがあるので、注意を要する。可能ならHIV-2遺伝子検査を行う。

*3　HIV-1/2鑑別検査を確認検査の前に実施することも可能。鑑別検査でHIV-2陰性の場合は、HIV-2の感染は否定できる。

２-５　BED アッセイ【BED EIA HIV-1 Incidence Test】

２-５-１．BED アッセイとは

HIV 感染後の経過が感染初期（Recent seroconversion）なのか、長期間を経過（Long-term seroconversion）しているのかを判定するために、CDC が開発した ELISA 法を用いたアッセイ法である。今までの感染初期の概念は、「ELISA 法陽性で、WB 法判定保留かつ NAT 検査陽性」等、基準や感染時期が曖昧であったが、BED アッセイを用いることにより、世界基準での感染時期の推定が可能となる。

本法では血清中の総 IgG 抗体量に占める HIV gp41 抗原に対する抗体量を測定する。測定（OD ｎ）値が≦0.8 の場合を Recent seroconversion とし（Panel 血清を用いた研究により抗体陽転化後 155 日以内）、OD ｎ値が>0.8 の場合を Long-term seroconversion と判定する。地域や検出年、病院や保健所での受診日により結果は様々ではあるが、概ね全体の 30～50％の範囲内で Recent seroconversion と判定されることが多い。

使用キット：Aware BED EIA HIV-1 Incidence Test (Calypte,Co.LTD)
説明書⇒http://www.calypte.com より入手可能
販売代理店を通じて購入可能
使用血清量：5～20μL

注意事項：
① 個体差があるため、このキットは個々の診断を目的に使用すべきではなく、集団としてみる場合に使用が可能である。
② エイズ患者を含む長期感染の 2～3%が、Recent infection として分類されることがあり、エイズ患者や CD4 細胞数が少ない患者は検査対象から除外すべきである。
③ サブタイプ B, E, D の gp41 ペプチドを使用している。サブタイプ A, C, F についても同等の感度を有するともされているが、サブタイプによっては注意が必要である。

２-５-２．BED アッセイ検査手順

Ⅰ　準備するもの
- BED アッセイ冷蔵パック：プレート、サンプル希釈液等（4℃保存）
- BED アッセイ冷凍パック：コントロール、HIV-1 BED Peptide、SA-HRP 等（-20℃保存）
- 8 連マイクロピペット（200μL）およびチップ
- マイクロピペットおよびチップ
- プレートインキュベーター（37℃）
- ボルテックスミキサー
- 96well プレート洗浄機
- プレートリーダー（主波長 450nm／副波長 630～650nm）
- プレートミキサー
- タイマー
- コントロールおよび血清希釈用チューブ（容量 1.5mL 程度）
- 試薬調製用チューブ（容量 15mL 程度）および試薬分注用リザーバー
- 洗浄液調製用ボトル（容量 500mL 程度）

Ⅱ　手順
1．　サンプル希釈液を用いて、コントロールおよび血清を 1:101 希釈し、BED アッセイプレートに希釈したコントロールおよび希釈した血清を 100μL ずつ指定の場所に分注する。
2．　BED アッセイプレートにカバーシールをし、37℃で 1 時間インキュベーションする。
3．　サンプル希釈液を用いて HIV-1 BED Peptide を 1:1001 倍希釈する。
4．　1×Wash Buffer を使用して、300μL/well のプレート洗浄を 4 回行う。最後の洗浄の後、ペーパータオルの上にひっくり返し、完全に水気を切る。
5．　希釈した HIV-1 BED Peptide を 100μL ずつ分注し、カバーシールをし、37℃で 1 時間イン

キュベーションする。

６．　サンプル希釈液を用いて Streptavidin-HRP Conjugate(SA-HRP) を 1:1001 倍希釈する。

７．　1×Wash Buffer を使用して、300μL/well のプレート洗浄を 4 回行う。最後の洗浄の後、ペーパータオルの上にひっくり返し、完全に水気を切る。

８．　希釈した SA-HRP を 100μL ずつ分注し、カバーシールをし、37℃で 1 時間 30 分インキュベーションする。

９．　1×Wash Buffer を使用して、300μL/well のプレート洗浄を 4 回行う。最後の洗浄の後、ペーパータオルの上にひっくり返し、完全に水気を切る。

１０．TMB 試薬を 100μL ずつ分注する。

１１．25℃の暗所で 15 分インキュベーションする。

１２．反応停止液を 100μL ずつ分注する。

１３．プレートリーダーで、吸光度を測定する（主波長 450nm／副波長 630～650nm）。

Ⅲ　OD 値の計算および結果の評価

１．コントロール

① NC の値が測定範囲内に入っているか確認する。

② CAL、LPC、HPC の OD 値（中央値）が測定範囲内に入っているか確認する。

③ CAL の中央値を元に LPC および HPC の ODn 値を求め、測定範囲内に入っているか確認する。

２．サンプル

① CAL の中央値を元にサンプルの ODn 値　($ODn = OD_{sample}/OD_{CAL（中央値）}$)を求める。

② ODn 値＞1.2 の場合・・・Long-term seroconversion と判定
ODn 値≦1.2 の場合・・・3 重測定の確認試験を実施

③ 確認試験において、
ODn 値＞0.8 の場合・・・Long-term seroconversion と判定
ODn 値≦0.8 の場合・・・Recent seroconversion と判定

３． ウイルス分離

３-１　ウイルス分離法（通常法）

被検者の末梢血単核球(PBMC)と、PHA等で刺激し幼若化した健常人のPBMCとを混合培養し、増殖してくるHIVを検出する方法であり、ウイルス感染の最も確実な診断が可能となる。

【方法】

<u>健常人PBMCの分離</u>

健常者よりEDTA添加した注射筒で末梢血を10～20mL採血する。

1. 採血後なるべく速やかに以下の方法にて末梢血単核球(PBMC)を分離する。50mLのチューブを1サンプルあたり3本用意する。それぞれのチューブにPBS(−)を10mLおよび 30mL、そしてリンパ球分離液(フィコールパックなど)を20mL入れる。
2. 採血した血液を10mLのPBS(−)が入ったチューブに入れ、血液を2倍希釈し、次にリンパ球分離液の上に希釈した血液を、ピペットを用いて静かに(境界面を乱さないように)重層する。これを20℃、2400rpm (約540 g)、15分間遠心する。
3. 上層の血清部分のほとんどを除く。白色のPBMC層から下部の赤血球層近く までピペットで採取する。採取したPBMCを用意した30mLのPBS(-)に加えてゆっくりとピペッティングする。
4. 20℃、1300rpm (約240 g)、5分間遠心し、PBMCを洗う。
5. 5%のウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培養液にて2回洗う。

<u>健常人PBMCの幼若化</u>

6. 0.1%のPHA (Difco)を添加した50mLの20%のウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培養液にて、PBMCを3-4日間培養し幼若化させる。
7. 培養後、セルバンカー(JUJI FIELD)に再浮遊し、$5\times l0^{6}$～10^{7}個ごとに分注し、-85℃で凍結保存する。（長期保存する場合は-135℃が望ましい。）

<u>被験者のPBMCの分離と共培養</u>

8. 被検者よりEDTA入り採血管にて末梢血を10～20mL採血する。
9. 上述の健常人末梢血からのPBMC分離と同様に、採血後なるべく速やかにPBMCを分離する。
10. 5%のウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培養液にて2回洗浄後、保管していた健常人幼若化PBMCと共に、培養フラスコ(容量75mL、ベントキャップ)を立てた状態で37℃のCO_2インキュベーター内にて混合培養する(液量約20mL)。培養液には20%のFCSと20-50U/mLのインターロイキン2を添加した、抗生物質を含むRPMI-1640培養液を用いる。
11. 培養5日目に新たな健常人幼若化PBMCを添加する。
12. 3～4日に1回、培養液を半量新しいものと交換し、 週1回培養上清を採取し、-80℃に保存する。
13. 保存した培養上清をMAGIC-5A細胞に感染させ、ウイルスの分離の成否を確認する(別項参照)。

【留意点】

HIV-1に感染している場合は、ウイルスは数日～6週間のあいだに増殖してくる。しかし全ての感染者において分離されるとは限らず無症候性キャリア(AC)の状態でのウイルス分離率は40～70%である。

【注】

ウイルス分離の成否は、培養上清中のp24抗原の検出や逆転写酵素活性の検出を用いても可能であるが、その場合コストが高くつく。

３-２． PBMC 共培養による HIV 高効率分離法

１）概要

この方法は、抗 CD8 ビーズを用いて健常人 PBMC 及び患者 PBMC から CD8 陽性細胞を取り除き、これらを混合し、抗 CD3 抗体を加え、共培養を開始し、HIV-1 分離を行う。この方法は加藤ら（慶応大学医学部）によって確立され、血漿中 HIV RNA コピー数が 1000 copies/ml 以上の症例では、80% 以上の高効率でウイルス分離が可能である[1, 2]。

２）試薬および器材

抗凝固剤 CPD 液入り真空採血管(ニプロネオチューブ：NP-SC0507、ニプロ）
PBS(-)（Invitrogen/GIBCO）
PBS(-) (2% FBS)： PBS(-)に 2％ FBS を加える。
Ficoll-Paque PLUS （GE Healthcare）
Dynabeads M-450 CD8 （Dynal）
rIL-2 （イムネース注 35、シオノギ）
RPMI 1640 Medium （Invitrogen/GIBCO）
RPMI 1640 (30% FBS)： RPMI 1640 Medium にストレプトマイシン（0.1 µg/mL）、ペニシリン（100 単位/mL）、rIL-2（70 単位/mL）、FBS（30％）を加える。
抗 CD3 抗体（CLB-CD3、PeliCluster）： PBS(-)で 50 倍希釈し、500 µL ずつ分注し、凍結保存する。

３）機器

低速冷却遠心機、CO_2 培養器
MPC（Magnetic Particle Concentrator、Dynal）
HIV-1 p24 測定用装置（mini VIDAS、SysmexBiomerieux）

４）方法

（1 日目）

<u>健常者 PBMC の準備</u>

(1) 健常者から 20 mL の静脈血を採血し、抗凝固剤入真空採血管に約 5 mL ずつ分注し転倒攪拌する。

(2) 血液をよく混合した後、2,000 rpm(約 960 g)で 10 分間遠心する。

(3) 血漿部分をトランスファーピペットで取り、別の容器に保存する。

(4) この血液に、取り除いた血漿とほぼ等量の PBS(-)（2〜3mL/tube）を加えてよく混合する。

(5) Ficoll-Paque Plus（室温）を 5 mL ずつ 4 本の 15 mL 遠沈管に入れ、その上に PBS(-)で希釈した血液を、Ficoll とほぼ等量静かに重層する。

(6) 1,500 rpm(約 540 g)、20°C で 30 分間遠心する。

(7) PBMC 層の上層部分を取り除く。

(8) 新しい 4 本の 15 mL 遠沈管に 5 mL の PBS(-)（室温に戻しておく）を入れておき、そこへ Ficoll-Paque Plus 層の上部にある PBMC 層（1.5 mL 以下）を加えてよく混ぜる（このとき、10 mL の PBS(-)に 2 本の遠沈管からの PBMC 層を加えてもよい)。

(9) 1,200 rpm(約 350 g)、20°C で 15 分間遠心する。

(10) 上清を取り除き、5 mL の PBS(-)で細胞を懸濁する。

(11) 1,000 rpm(約 240 g)、20°C で 10 分間遠心する（このとき、2 本分の細胞懸濁液を 1 本にまとめてもよい)。

(12) 上清を取り除き、5 mL の PBS(-)で細胞を懸濁する。

(13)　細胞懸濁液を 1 本にまとめ、この細胞懸濁液を少量取って細胞濃度を計測する。

(14)　1,000 rpm、20°C で 10 分間遠心する。

(15)　上清を取り除き、(13)で求めた細胞濃度を基に 2 x 10^7 細胞/mL になるように PBS(-) (2% FBS) で細胞を懸濁する。

(16)　この細胞懸濁液に 1/7 体積量の Dynabeads M-450 CD8 を加える。Dynabeads は取扱説明書[3]にしたがい、あらかじめ(2% FBS)で洗浄しておく。

(17)　4°C で 30 分間反応させる。5 分ごとにチューブを手で軽くたたいて細胞懸濁液を混ぜる。あるいは、旋回ミキサーを用いて細胞懸濁液を攪拌してもよい。

(18)　PBS(-) (2% FBS)を 5 mL 加え、静かに懸濁する。

(19)　MPC にチューブを装着、2 分間静置し、Dynabeads を試験管壁面に吸着させる。

(20)　液体部分をトランスファーピペットで取り、新しい 15 mL 遠沈管に移す。

(21)　1000 rpm、20°C で 10 分間遠心する。

(22)　上清を取り除き、PBMC を 5 mL の RPMI 1640 (30% FBS)で懸濁する。

(23)　この細胞懸濁液の細胞濃度を計測する。

(24)　この細胞濃度を基に、1 x 10^6 細胞/mL になるように RPMI 1640 (30% FBS)を加える。

(25)　すぐに共培養を行わない場合は、培養フラスコに移し、37°C の CO_2 培養器の中に置いておくことができる（数時間程度)。

<u>感染者 PBMC の調製</u>

HIV 感染者から 20 mL の静脈血を採血する。採血した血液から、(1)〜(25)で述べた方法で（健常者の場合と同様）PBMC 分離・CD8 陽性細胞の除去の操作を行い、1 x 10^6 細胞/mL の PBMC 液を調製する。培養は、なるべく採血当日に開始する。採血後 1 日たつと、分離効率はやや落ちる。

(3)の血漿は血漿中 RNA コピー数測定用にストックする。

(13)の細胞懸濁液の一部をプロウイルス HIVDNA の解析用にストックする。

<u>共培養</u>

(1)　5 mL の健常者 PBMC 液（1 x 10^6 細胞/mL）と 5 mL の感染者 PBMC 液（1 x 10^6 細胞/mL）を培養フラスコ内で混合する。

(2)　40 µL の抗 CD3 抗体液（50 倍希釈）を加える。

(3)　37°C の CO_2 培養器に入れて共培養を開始する。(培養フラスコは培養器中で立てておく）

（4 日目）

(1)　培養フラスコ内の培養液を新しい 15 mL 遠沈管に移し、この培養液を少量取って細胞濃度を計測する。

(2)　1,000 rpm、20°C で 10 分間遠心する。

(3)　上清を採取し、-80℃でストックする。

(4)　(1)で計測した細胞濃度を基に、PBMC を RPMI 1640 (30% FCS)に懸濁し、0.5 x 10^6 細胞/mL の細胞懸濁液を調製する。

(5)　(4)で調製した細胞懸濁液 10 mL を培養フラスコに移す。

(6)　37°C の CO_2 培養器に入れて培養を継続する。培養フラスコは立てておく。

(7)　採取した培養上清の p24 抗原量を測定する（HIV p24 II、SysmexBiomerieux)。

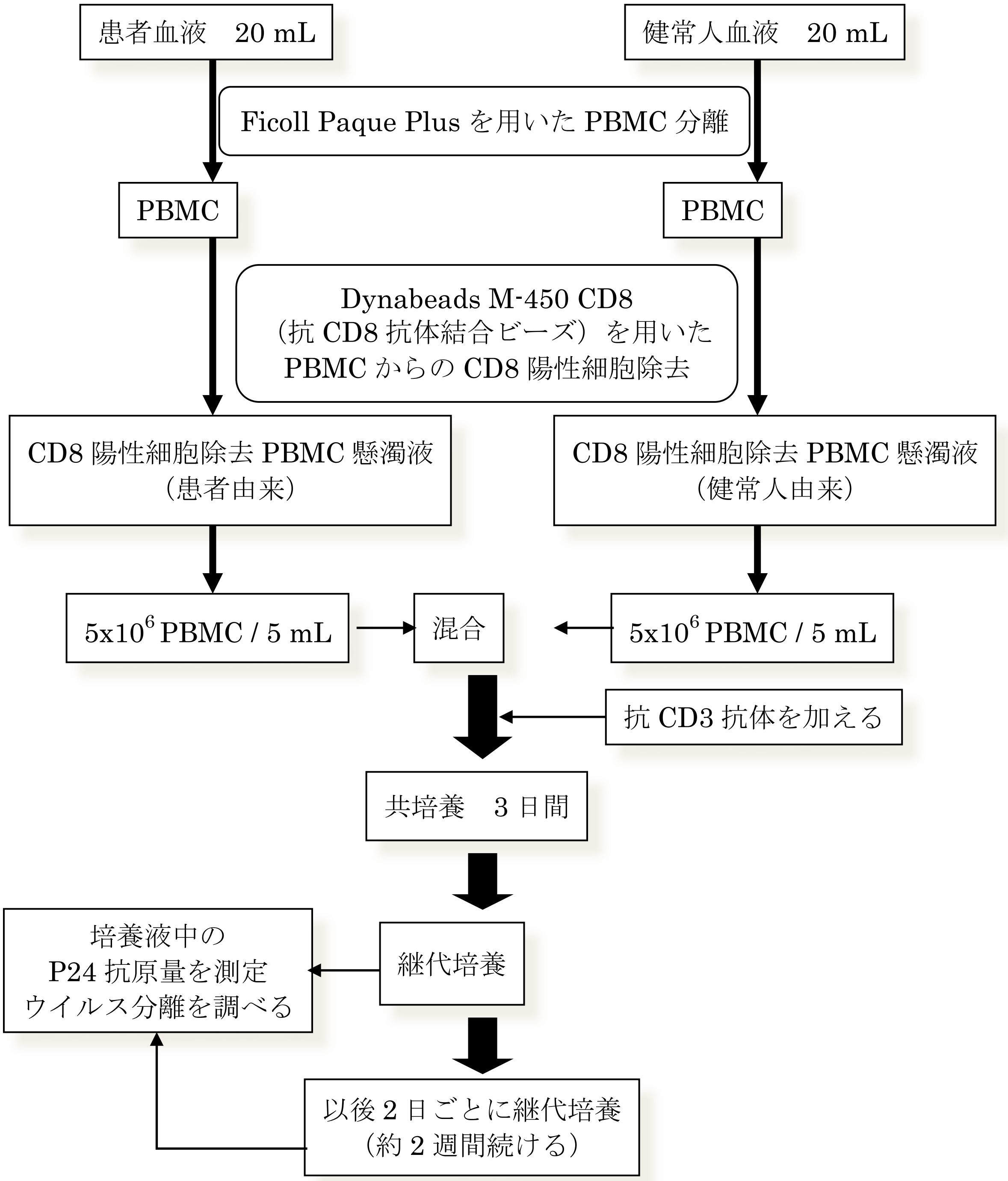
(8)　(5)で残った PBMC は、セルバンカーに懸濁して-80℃で保管する。

以後、2 日ごとに継代培養を続ける。PBMC の増殖が低下してくるため、上清中の p24 抗原量は共培養開始 1 週間〜2 週間後にピークとなることが多い。

５）参考文献

1. 加藤真吾他．薬剤耐性変異の解析法の開発に関する研究．厚生労働省厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業　HIV の検査法と検査体制を確立するための研究　平成 13 年度研究報告書．165-174　(2002).
2. Marijke Th. L. Roos, Maria Prins, Maarten Koot, Frank de Wolf, Margreet Bakker, Roel A. Coutinho, Frank Miedema, Peter Th. A. Schellekens; Low T-cell responses to CD3 plus CD28 monoclonal antibodies are predictive of development of AIDS. AIDS: 12:1745-1751(1998)
3. Dynabeads を用いた細胞分離、Dyanbeads Letter, http://www.invitrogen.jp/tech/DynabeadsLetter/DL-19.pdf

HIV 高効率分離法フローチャート



３-３． MAGIC-5A 細胞と磁気粒子による HIV 分離法

【はじめに】

HIV-1/2 のウイルス分離は通常感染者の末梢血単核球を PHA などの Mitogen で刺激し IL-２添加培養液で未感染者由来ブラスト化単核球との共培養で行う。従来ウイルス分離効率を高めるため、末梢単核球から CD8 陽性 T リンパ球の除去など様々な工夫がされてきたが、ウイルス分離の確認には培養上清中の HIV-1 p24 gag 抗原の検出、あるいは逆転写酵素活性の測定などが必要となり培養手技技術などに煩雑な手続きが必要であった。

ここで紹介するウイルス分離法は HIV/SIV 感染指示細胞である MAGIC-5A 細胞とレンチウイルス濃縮試薬の磁気粒子と磁石を応用した HIV ウイルス分離法で、通常法でウイルス分離が困難な折の代替法として参考のため紹介する。

MAGIC-5A 細胞は当室で HIV/SIV 感染価測定のため Coreceptors が発見された 1996 年に樹立した細胞株である。HeLa 細胞を親株として CD4 発現と HIV-1 LTR 下流に SV40 Large T-Antigen の核移行シグナルを付加したβ-Galactosidase を組み込んだ HeLa-CD4-LTR-□eLa-細胞株（別名 MAGI 細胞: Kimpton J and Emerman M J.Virol 66; 2232, 1992）に、当室で構築した発現ベクター*pEFBOSbsrHuCCR5* で Coreceptor CCR5 を発現し、CD4 発現をより安定に高めるため更に *pEFBOSpacCD4* を組み込み薬剤で選択し、HIV-1 臨床株に感受性が高い細胞クローンを複数回の限界希釈クローニングを経て選別した細胞株である。MAGI 細胞の呼称は、Michael Emerman らが HeLa-CD4-LTR-β-gal 細胞株に臨床ウイルス株を感染させると多核巨細胞が形成され、固定後 X-gal で染色することにより感染価が測定できることから、この測定法は Multinuclear Activation of a Galactosidase Indicator Assay，略して MAGI アッセイと呼ばれ頻用されるようになった事に由来する。その後 1996 年に Edward A. Berger らにより CXCR4 及び CCR5 などの Coreceptor が同定された（Science 272: 872, 1996）。この MAGI 細胞の親細胞株 HeLa は CXCR4 を構成的に発現しているので、MAGI 細胞に CCR5 を発現したサブクローン細胞株であることから MAGIC-5A (MAGI-CCR5 -A)と名付けた。

【ウイルス分離】

準備するもの

- 通常の培養に必要な培養プレート、フラスコなど
- 回転ローテーター （例えばタイテック RT-30mini など、なければ手で５分毎に緩やかに混合しても良い）
- Dulbecco’s MEM と 5%FCS, SP 添加 Dulbecco’s MEM
- Dulbecco’s PBS(-)と Trypsin-EDTA
- MAGIC-5A 細胞
- Viro-Adembeads (Ademtech com 商品コード 07010 フナコシ扱い)
  ウェブサイトは http://www.ademtech.com/products.aspx?id=104&id_p=58
  このサイトから Protocol を入手出来る。
- 精製用磁気スタンド Adem-Mag SV (1.5 mL 用: 商品コード 20101)など (他のプラスミド精製用の磁気スタンドでも利用できる)
- 培養用磁気プレート（例えば MagnetoFACTOR-24 24 穴プレート用磁気プレート Chemicell com 商品コード 9009 日本ジェネティクス扱い）
- ２倍固定液； 0.2% formaldehyde, 0.04% glutaraldehyde in PBS
- X-Gal 染色液； 8μL 0.5M potassium ferrocyanide,
  8μL 0.5M potassium ferricyanide
  8μL 0.25 M $MgCl_2$
  8μL 40 mg/mL X-gal
  1 mL PBS

注意：MAGIC-5A 細胞は都合４種類の発現ベクターで選択培養し、限界希釈クローニングで樹立したクローン細胞株である。発現させた抗原の発現維持にはそれぞれ用いた発現ベクターの選択薬剤である;

0.2 µg/ mL G418 (Sigma),
0.1 µg/ mL hygromycin (Sigma)
1.0 µ□□ mL blasticidin S hydrochloride (Funakoshi)

1.0 µ□□ mL puromycin (Sigma)

などの添加が必要であるが、実際には煩雑なので通常の培養では添加していない。分与を受けてから大量に増やして Cell Banker などで−80℃に凍結保存し、ウイルス感染感度が低下したら新たに起こし直した方が簡便である。云うまでもないが HIV 分離は BSL3 での作業が必要で、各操作は注意して行うことと廃棄物の処理は各施設の規定に従うことが必要である。

【ウイルス分離手順】

1. ウイルス分離の前日、あるいは 6 時間前に 10 x 10^5 / mL MAGIC-5A 細胞を 0.5 mL ずつ 24 穴培養プレートの各穴に播いてプレート底に付着伸展させる。
2. Viro-Adembeads を 1 検体あたり 10 ～ 25μL 滅菌 1.5 ml Eppendorf Tube に取り、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け 1 分間程静置して磁気ビーズを集め、上清を捨てる。
3. キットの Binding Buffer で洗浄し、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け磁気ビーズを集め、上清を捨てる。
4. 検体（血清もしくは血漿） 1 mL を加えて、ローターなどで室温 20 分緩やかに混合する。
5. 軽く遠心し、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け磁気ビーズを集め、上清を別の Tube に移し替える。
6. 血清なしの培養液 1 mL で洗浄し、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け 1 分間程静置して磁気ビーズを集め、上清を捨てる。
7. 血清なし培養液 0.5 mL で再懸濁し，予め培養してある MAGIC-5A 細胞の各穴に添加し、培養プレートを磁気プレートに密着させて 1 時間以上培養する。
8. 毎日、多核巨細胞などの CPE 出現を検鏡する。
9. 過剰増殖気味になったら培養液を除去し、PBS で洗浄して Trypsin-EDTA で細胞を剥がし、10 ～ 20 分の 1 程度に Split-Down して培養を継続する。
10. およそ 2 週間 CPE が出現するまで培養を継続する。
11. ウイルスが分離されたら新たな MAGIC-5A 細胞へ感染させウイルスを増殖させる。この場合 MAGIC-5A 細胞が CPE でぼろぼろになるまで培養するとウイルスコピー数を 10^7 copies/mL まであげることが出来る。

注意； 培養プレートサイズ、播き込む細胞数と継代サイクルなどは検体中のウイルスの特性とウイルス量などにより変動するので、実際に分離培養して各自経験して至適条件を見つけられたい。多くの場合、検体に“生きた”ウイルスが 10^3 copies/mL 以上であればウイルス分離が出来ることが多い。ウイルスが分離される初期の培養では「フクロウの目」のような細胞塊が出現することが多い。磁気ビーズが混在しているので慣れるまで倒立位相差顕微鏡下で CPE 検出に戸惑うが、検体中のウイルス量が多いと 3 日間の培養で分離できることもある。増殖速度が遅いウイルス株では「フクロウの目」のような細胞塊が出現した培養上清を再度磁気ビーズで濃縮し、新しい MAGIC-5A 細胞へ感染させると、より早くウイルス分離増殖が可能なことがある。この方法で分離したウイルスと末梢血単核球での通常法で分離したウイルスとの性状の差については今のところデータが充分ではない。感染細胞のゲノムは HIV 全長ゲノムの Long PCR による増幅の良い鋳型になる。実際我々はこれを用いて感染性クローンを作成している。

この磁気ビーズを末梢血単核球に混ぜて培養してもウイルス分離は可能である。本法は MAGIC-5A 細胞が付着性細胞であることを利用して磁気ビーズに補足したウイルスを磁気プレートに接着させた培養プレート上の細胞へ強制的に密着させる操作がウイルス分離を促進する想定のもとでのプロトコールである。

分離増殖させた HIV ウイルスの感染価は､同じ感染価測定細胞である MAGIC-5A 細胞で測定できる。また別項に記載されている KK-TaqMan RT-PCR でウイルス・コピー数の定量もできる。

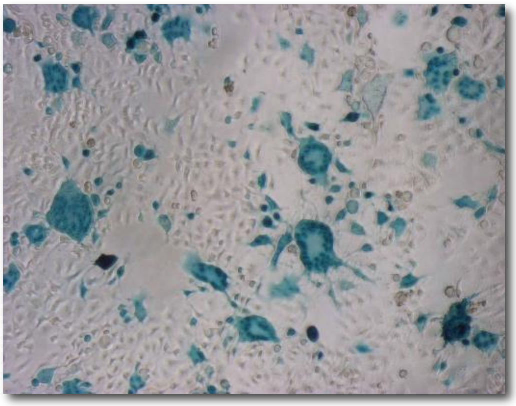
【MAGIC-5A 細胞によるウイルス感染価測定】

1. ウイルス感染価測定の前日、あるいは 6 時間前に 1 x 10^5 / mL MAGIC-5A 細胞を 100μL ずつ 96 穴培養プレートの各穴に播いてプレート底に付着伸展させる。
2. 先に分離したウイルス液を 25μL A 行に添加し､良く混ぜて 25μL B 行へ移し良く混合する。

これを繰り返して５倍希釈系列を作成し、48 〜 72 時間培養する。

3. 各穴に 100μL の固定液を加え数分固定し、Flip-Out で固定液を除去して、ペーパータオルの上で残余固定液を除去する。
4. 各穴に 100μL の染色液を加えインキュベーターで 1 時間以上染色し、充分発色したら Flip-Out で染色液を除去し水道水で洗浄し、観察のため水道水 200μL を各穴に加える。
5. 100 個前後の核が青染したウェルの陽性細胞数をカウントし、希釈係数を掛けて元のウイルス液のおおよその感染価を算定する。

注意；HIV-1 Real-time RT-PCR 法でのウイルスコピー数は、この感染価の５倍から１０倍であることが多い。この感染価の見かけ上の低さは培養上清の上層にあるウイルスはウェル底に付着している MAGIC-5A に感染していないからと考えられる。他に LTR 下流に核仁移行シグナルを付加した EGFP を組み込んだ HIV 感染指示細胞株 HeLa 4, 5 LTR-nEGFP もウイルス分離に利用している。この細胞株では蛍光装置付培養顕微鏡でリアルタイムに HIV/SIV の感染が追跡できるので感染初期の検出が容易であるが、上記の MAGIC-5A 細胞よりもやや感受性が低く、ウイルス産生量が若干少ないので説明は割愛する。



図の説明： MAGIC-5A 細胞に HIV-1 subtype C Indie-C1 ウイルスを感染後染色した。多核巨細胞と一つ一つの細胞の核が X-Gal で青く染まっているのが判る。

MAGIC-5A 細胞の分与と技術的アドバイスについて：著者にメールで連絡して下さい。

国立感染症研究所 エイズ研究センター　第２室
巽　正志
tatsu@nih.go.jp
電話：03-5285-1111 内線 2320

４. HIV ゲノムの増幅とサブタイプ・サブタイプ間組換体判定法

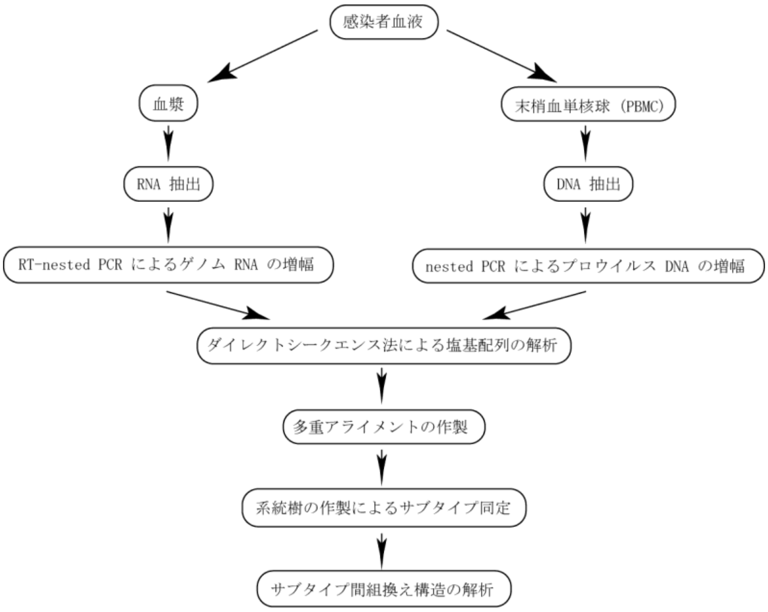
HIV は、そのゲノム構造から HIV-1 と HIV-2 に分類され、HIV-1 はさらにグループＭ、Ｎ、Ｏ、Ｐの４つのグループに分けられる。世界流行の主要な原因ウイルスである HIV-1 グループＭ は、Ａ, Ｂ, Ｃ, Ｄ, Ｆ, Ｇ, Ｈ, Ｊ, Ｋの９つのサブタイプに分類され、ＡとＦはさらに A1 と A2、F1 と F2 に分けられる。またサブタイプ間の組換体が多数報告されている。そのうち流行を形成しているものを流行型組換体 (Circulating Recombinant Form, CRF)、それ以外は孤立型組換体 (Unique Recombinant Form, URF) と呼ばれている。2011 年 12 月現在、51 種の CRF が報告されている (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV / mainpage.html)。

一方 HIV-2 の流行は主として西アフリカ地域に限局されているが、欧米さらに我が国を含むアジア地域にも散発的な感染の広がりがある。HIV-2 はグループ A-G（従来サブタイプと呼ばれていたが、遺伝的多様性の大きさから、HIV-1 分類階層のグループに対応する）の 7 種に分類されるが、グループ A, B が主要な流行株で、その他のものはごく少数の感染例が知られているに過ぎない。HIV-2 に関しては最近我が国でグループ A, B 間の流行型組換体 CRF01_AB が報告された（後節 1-3 参照）

このような遺伝子型分類を手がかりとして、流行の起源、ウイルス伝播経路などを推定することができる。

ここでは、HIV-1 グループM感染者由来検体から、そのサブタイプ・サブタイプ間組換構造を決定するまでの方法を示す。そのフローチャートを図 1 に示す。

（図 1 検体収集からサブタイプ・サブタイプ間組換え構造決定までの流れ）



４-１. ゲノムの増幅とダイレクトシークエンス法による塩基配列の決定

［注意点］

RNase の混入や検体間のクロスコンタミネーションを防ぐため、すべての試薬調整の操作は、紫外線照射機能の付いた専用の無菌ボックスなど清浄な環境で行う。ピペット装置も専用のものを用意し、チップはエアロゾル防止用のフィルターつきのものを用いる。再留水 (DW) も分子生物学グレードのものを購入することが望ましい。

反応が正しく行われているかどうか、またコンタミネーションによる誤った増幅が起きていないかどうかを確認するため、実験ごとに陽性対照と陰性対照を置いて確認する。

４-１-１ プライマーの準備

HIV-1 では、株間で塩基配列の多様性が著しく高いので、株間で相同性が高い領域を選んでプライマーを設計する必要がある。表１に *pol* 遺伝子のプロテアーゼから逆転写酵素領域まで、*env* 遺伝子の C2 から V5 までの領域を増幅するためのプライマーを紹介する。いずれの領域も、試薬の性能の向上を踏まえて、1 種類の RT-PCR 産物を用いて複数の領域の 2nd PCR を行うように設計されている。またこれら２つの領域は重複していないので、RT-PCR を１本のチューブで同時に行って、試薬や貴重な抽出 RNA の無駄を防ぐこともできる。

（表 1 HIV-1 サブタイピングのためのプライマー）

pol PR - RT			env C2 - V5		
ID	プライマーの配列	HXB2	ID	プライマーの配列	HXB2
RT-PCR					
509A	5'-AGA CAG GYT AAT TTT TTA GGG A-3'	2074-2095	573A	5'-ATA CAT TAT TGT ACC CCR GCT GG-3'	6867-6887
512B	5'-TAC TTC TGT TAG TGC TTT GGT TCC-3'	3425-3402	004B	5'-GTC TGG CCT GTA CCG TCA GCG-3'	7851-7831
2nd PCR					
510A	5'-AGA GCC AAC AGC CCC ACC AG-3'	2148-2167	007A	5'-AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA C-3'	6945-6969
504B	5'-ACT TTT GGG CCA TCC ATT CC-3'	2611-2592	575B	5'-ATG GGA GGG GCA TAC ATT GC-3'	7540-7521
513A	5'-GAC CTA CAC CTG TCA ACA TAA TTG G-3'	2485-2509	574A	5'-TTA ATT GTA GAG GGG AAT TTT TCT AYT G-3'	7351-7378
530B	5'-TGG AAT ATT GCT GGT GAT CC-3'	3031-3012	521B	5'-GCC CAT AGT GCT TCC TGC TGC TCC-3'	7816-7793
532A	5'-AAC TCA AGA CTT CTG GGA AGT -3'	2798-2818			
514B	5'-TAA TCC CTG CAT AAA TCT GAC TTG C-3'	3372-3348			

４-１-２ テンプレートの調整

一般的に、感染者由来血漿から抽出した RNA をテンプレートとして用いる。抽出には、市販の精製キットを用いる。但し、HAART 療法が奏効している症例などで、コピー数が著しく低い場合には増幅が困難なことがある。そのような時には、感染者由来 PBMC からプロウイルス DNA を含む全 DNA を抽出し Nested PCR を行うことで上手くいく場合もある。比較的少量の細胞からスピンカラムを用いて全 DNA を精製するキットも、各社から発売されている。ここでは、High Pure Viral RNA Kit（ロシュ）を用いた RNA 抽出法を示す。

１．400μL の Working Solution に 200μL の患者血漿を加えてボルテックスした後に、コレクションチューブ上にセットしたフィルターチューブに入れる。
２．10,000rpm (8,000 g)で 15 秒間遠心する。
３．フィルターチューブを新しいコレクションチューブ上にセットし、450μL の Wash Buffer を入れる。
４．10,000rpm (8,000 g)で 15 秒間遠心する。
５．フィルターチューブを新しいコレクションチューブ上にセットし、450μL の Wash Buffer を入れる。
６．10,000rpm (8,000 g)で 15 秒間遠心した後、回転数を 12,000rpm に上げ、10 秒間遠心する(Wash Buffer に含まれるエタノールを完全に除くため)。
７．フィルターチューブを RNA 回収用チューブ上にセットし、50μL の Elution Buffer をフィルター上に入れる。
８．10,000rpm (8,000 g)で 15 秒間遠心する。フィルターチューブを捨て、コレクションチューブに溶出された RNA を回収する。

４-１-３. RT-PCR

１本のチューブで逆転写反応から PCR まで行えるキットを用いると、簡便でかつ実験操作によるコンタミネーションや RNase 混入のリスクを下げることができる。近年各社から発売されるようになった改変 MMLV 由来逆転写酵素を用いたキットは、増幅の効率が良いようである。以下に PrimeScript One Step RT-PCR Kit（タカラバイオ）を用いた実験例を示す。

1.試薬調整用のキャビネットで、以下の反応液を調整する。

D.W. (RNase free)	30.5μL
10X one step RNA PCR buffer	5.0μL
One Step Enhancer Solution	1.0μL
10mM dNTP	2.0μL
20uM Primer 509A	1.0μL
20uM Primer 512B	1.0μL
20uM Primer 573A	1.0μL
20uM Primer 004B	1.0μL
RNase inhibitor	1.0μL
Primescript RTase	0.5μL
TaKaRa EX Taq HS	1.0μL

2.鋳型用のキャビネットに移り、精製した RNA を 5μL 入れて数回ピペッティングする。
3.サーマルサイクラーを以下の条件にセットし、反応を開始する。

50℃　30 min.
94℃　2 min.
↓
94℃　30 sec.
55℃　30 sec.　} 30 cycles
72℃　3 min.
↓
72℃　7 min.
↓
4℃　soak

４-１-４. 2nd PCR

１回（30-35 サイクル）の PCR で、アガロースゲル電気泳動を使った増幅の確認やシークエンス反応のテンプレートとして充分な量の産物を得ることは難しいので、RT-PCR 産物の一部を使って 2nd PCR を行う。プライマー以外の試薬があらかじめ混合されているキットを用いれば、実験操作のミスやコンタミネーションのリスクを減らすことができる。ここでは Premix Taq Ex Taq version（タカラバイオ）を用いた実験例を示す。

１. 試薬調整用のキャビネットで、以下の反応液を調整する。

D.W. (RNase free)	18.0μL
20uM sense primer*	1.0μL
20uM anti-sense primer*	1.0μL
Premix Taq	25.0μL

*使用するプライマーは図３を参照。

２. 鋳型を扱うためのキャビネットに移り、RT-PCR 産物を 5μL 入れて数回ピペッティングする。
３. サーマルサイクラーを以下の条件にセットし、反応を開始する。

94℃　1 min.
↓
94℃　30 sec.
55℃　30 sec.　} 30 cycles
72℃　1 min.

↓
72℃　　7 min.
↓
4℃　　soak

４-１-５．増幅の確認

増幅の有無は、2nd PCR 産物の一部をアガロースゲル電気泳動して確認する。陽性対照で増幅が見られること、陰性対照（試薬コントロール）で増幅が見られないことを確認する。増幅が成功していれば、正しい位置にバンドが見られる。

増幅が見られないからといって、HIV-1 陰性とは限らない。コピー数が少ない、あるいはプライマーのミスマッチの場合も考えられる。他のプライマーを試したり、増幅する領域を短くすることで増幅が見られる場合もある。血清あるいは血漿中のウイルスコピー数が少ない場合、前述のように感染者由来 PBMC から抽出した DNA をテンプレートとして用いることも考慮する。

４−１−６ プライマーの除去

増幅が確認された 2nd PCR 産物は、あらかじめシークエンス反応に邪魔な残存プライマーや dNTP などを除去しておく必要がある。シリカメンブレンに産物を吸着させて精製するキットが一般に良く用いられる。以下に、QIAamp PCR Purification Kit (QIAGEN) の使用例を示す。

１． PCR 産物に５倍量の PB バッファーを加え、ボルテックスしスピンダウンする。
２． QIAquick カラムをコレクションチューブにセットし、サンプルをカラムに入れる。
３． 13,000 rpm １分間遠心する。
４． コレクションチューブのろ液を除き、カラムに 700μL の PE バッファーを入れる。
５． 13,000 rpm １分間遠心する。
６． エタノールを完全に除去するため、 コレクションチューブのろ液を除いた後さらに 13,000 rpm １分間遠心する。
７． カラムを回収用のチューブにセットし、50μL の EB バッファーを入れる。
８． 13,000 rpm １分間遠心する。
９． ろ液（精製物）を回収し保存する。

４-１-７．シークエンス反応

PCR 産物を鋳型にシークエンス反応を行い、塩基配列を決定する方法をダイレクトシークエンス法という。HIV-1 は準種 (quasispecies) を形成しているが、ダイレクトシークエンス法ではマイナーな準種の配列や Taq ポリメラーゼによる mis-incorporation の影響は平均化され、大多数を占める準種の平均的な配列を知ることができる。分子疫学研究では良く用いられる手法である。

シークエンス反応に用いるプライマーは、2nd PCR に用いたものと同じものを使う。ダイレクトシークエンス法では塩基の判別があいまいな場所が出やすいので、必ず同じ領域を双方向から読み取り、オーバーラップを取って確認しておいた方が良い。

シークエンス反応後、Genetic analyzer による解析の妨げになる未反応のダイターミネーターを除去しなければならない。Centrisep（アプライドバイオシステムズ）のようなゲル濾過の原理を利用したスピンカラムがこの目的に用いられる。

以下に、BigDye Terminater Cycle Sequencing Kit ver.3.1（アプライドバイオシステムズ）を用いたシークエンス反応から Genetic analyzer で解析を始めるまでの方法を示す。シークエンス反応液量をメーカー推奨条件の半分にして行っているが、特に問題はない。

1. 反応液の調整

D.W.	2.5μL
Purified PCR product	2.5μL
1.6 uM Primer	1.0μL
Sequencing buffer	2.0μL

Sequencing reagent premix 2.0 μL

2. サーマルサイクラーを以下の条件にセットし、反応を開始する。

96℃ 10 sec ⎫
50℃ 5 sec ⎬ 25 cycles
60℃ 4 min ⎭

3. Centrisep カラムの上蓋を開けて 800 μL の D.W. を入れ、転倒させながらボルテックスする。そのまま室温で 30 分以上放置し、膨潤させる。

4. シークエンス反応が終わったら、再びカラムを転倒させながらボルテックスし、全体を混和して気泡を完全に除く。

5. カラムの上蓋を開ける。その時に下から気泡が発生していないことを確認する。気泡が発生した場合は、カラムを指ではじくなどして気泡を除く。気泡が無ければ、下蓋を開けてコレクションチューブにセットし D.W. を自然落下させる。下蓋を開けても水滴が落ちてこない時は、蓋を使って上から圧をかけて落とす。

6. 液面が樹脂の表面まで達したら、カラムをはずし、コレクションチューブに落ちた D.W. を捨てて、再びカラムをコレクションチューブにセットする。

7. 3,000 rpm、２分間遠心。樹脂がカラム中央に円柱状に立っているのを確認。これを崩さないように注意する。

8. シークエンス反応産物を円柱状の樹脂の中央に、樹脂の近くからゆっくりと滴下する。(チップを樹脂に刺さないように注意する。)

9. 3,000 rpm、２分間遠心。遠心後、回収用チューブに 20 μL 前後のろ液が回収されていることを確認する。

10. Vacuum concentrator を用いてサンプルを乾燥させる。

11. 乾燥させたサンプルを 20 μL の Hi-Di formamide に溶解、変性を完全にするため、95℃で２分間熱変性した後氷上で急冷する。専用のチューブないしはプレートにサンプルを移して Genetic analyzer にセットし、解析を開始する。

４-１-８. 塩基配列の読み直し

Genetic analyzer のランが終了すると同時に、塩基配列データが読み出される。機種により異なるが、プライマーの位置から 400 から 600 塩基までは、ほぼ読み直しの必要が無いデータが得られる。そのようなデータが得られなかった場合には、シグナルの強度が弱すぎたかあるいは強すぎて、配列を読み出すことができなかったと考えられる。シグナル強度の数値とシークエンス読み出し前の波形データを見れば、どちらの原因であったか確認できる。理想的な塩基配列が読み出された時のデータを覚えておくと良い。前者の場合、テンプレート量を増やすあるいはプライマーを変える、後者の場合、テンプレート量を減らすなどの対策が考えられる。

理想的な解析が行われたにもかかわらず、読み出された塩基配列に頻繁にあいまいな塩基が出現する場合、複数のサブタイプの重複感染例の可能性もある。あいまいな塩基が各サブタイプに特徴的な塩基の場所と一致しているかどうか、後述の多重アライメントを使って比較することで確認できる。

プライマーの近傍およびプライマーから離れた領域は、読み出された配列が正しくないことがある。また前述のように、ダイレクトシークエンス法では、比較的正確に読み取られた範囲内でも、塩基の判別があいまいなところが出ることがある。波形データを使って読み直すか、逆方向から読んだ塩基配列データを使って、系統解析に用いる塩基配列データを完成させる。

４-１-９. ブラスト・サーチ

ブラスト (BLAST, **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool の略) とは、一組の塩基またはアミノ酸配列をアライメントするアルゴリズムのひとつで、このアルゴリズムを用いてデータベース上に登録されている配列との相同性を検索することをブラスト・サーチという。

HIV の塩基配列の検索を行う場合には、ロスアラモス研究所のシークエンスデータベースのウェブページ（http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html）にある HIV BLAST を用いるのが便利である。

Nested PCR 法による DNA の増幅には、常にコンタミネーションの危険が伴う。既存の配列のコンタミネーションを否定する目的で、ブラストサーチが用いられる。もし既知の配列との相同性が極

めて高い場合には、コンタミネーションの危険が疑われる。
　一方、登録されているデータの中から、相同性の高い順にデータを示してくれるので、遺伝子型（サブタイプ／CRF）の簡易判定法としても用いることができる。

４-２．系統樹の作成とサブタイプ間組換え構造の解析

　系統樹解析は、塩基配列間の近縁関係を定量化し視覚的に表示する解析法であり、HIV-1 のサブタイプ判定にはこの方法が用いられる。さまざまな系統樹作成の方法があるが、HIV-1 のサブタイプ判定には、計算が容易でパソコンで簡便に処理できる近隣結合法（Neighbor-joining 法、NJ 法）が用いられる。
　近隣結合法による系統樹の作成は、①得られた塩基配列データと、サブタイプ帰属が既知の塩基配列（レファレンス株）の多重アライメント作成、②多重アライメントから塩基置換数の算出と距離行列の作成、③距離行列を基に近隣結合法による系統樹の作成、④作成した系統樹の分枝の信頼性の評価の４ステップからなる。数多くのソフトウェアが公開されているが、ここでは MEGA ver.5 (http://www.megasoftware.net/) を用いた、多重アライメントの作成からサブタイプ判定までの解析例と、サブタイプ間の組換えが疑われる検体の組換え構造解析の手法について示す。

４-２-１．多重アライメントの作成

　レファレンス株の塩基配列は、ロスアラモス研究所のシークエンスデータベース（http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html）からダウンロードし、FASTA 形式というフォーマット（図２）（.fsa, .fas, .fasta 等）で保存したものを用意する。テキストエディタやワープロソフトで開き、サンプルの塩基配列を加えて保存する（MEGA では、FASTA 形式だけでなく ab1 形式のものも読み取ることができるので、MEGA 上でデータを読み直し取り込むことも可能である）。

（図２FASTA 形式）

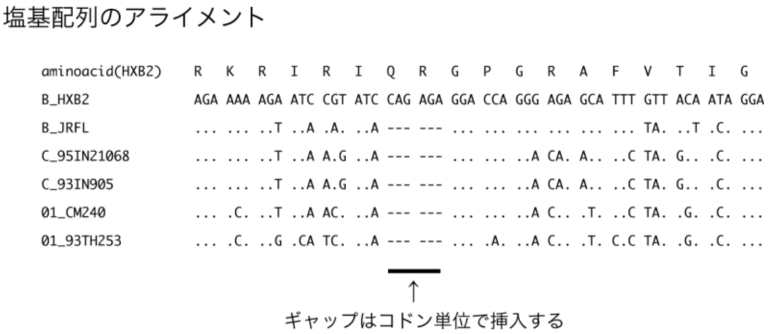
```
>( 株の名前 ) ( 改行 )
( 塩基配列 )

(例)
>CPZ_CPZGAB
CCTCAAATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTCATCCCAGTAAAAGTAGAAGGGCAACTATGTGAA
……………………
>A1_Q23-17
CCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCTCTTGTCACAGTAAGAATAGGGGGACAGCTAAAAGAA
……………………
>A1_SE7253
CCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCTCTTGTCACAGTAAAAATAGGGGGTCAGCTAAGAGAA
……………………
```

　FASTA 形式の塩基配列のファイルが作成できたら、MEGA を起動する。”File”メニューから”Open A File/Session”を選択する。”Analyze or Align File”と表示されるので”Align”を選択すると Alignment Explorer 画面が立ち上がる。Alignment Explorer の”Data” メニューから”Open” →”Retrieve Sequences From File”を選択し、FASTA 形式で保存したファイルを開く。
　多重アライメントは自動および手動のいずれの方法でも作成することができる。ClustalW を使って自動的に作成したい場合は”Alignment”メニューから”Align By ClustalW”を選択する。
　蛋白をコードする領域の多重アライメントを作成する場合、コドン単位で対応する塩基を合わせる必要があるので（図３）、手動で修正することがある。その場合には移動させたい塩基（あるいは領域）を左クリックでドラッグしながら選択し、メニューバーの”Move selected block left/right”を使って移動させる。
　また特定の株だけで挿入が見られる場所や、対応関係がつかない領域（例えば *env* 遺伝子の V1/V2 領域）は artifact の原因となるので除去する。この場合、削除したい範囲を左クリックでドラッグしながら選択し、”Edit”メニューから”Delete”を選択して削除する。
　このファイルを保存するには、”Data”メニューから”Save Session”を選択し、ファイル名をつけて保存する（.mas というファイルが作られる）。続けて系統樹作成を行う場合には MEGA 形式のファイル

を作らなければならないので、同じく”Data”メニューから”Export Alignment”→”MEGA Format”を選択し保存する（.meg というファイルが作られる）。

（図３ギャップ）



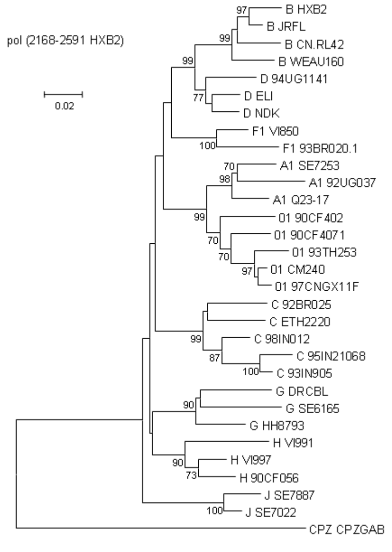
４-２-２．系統樹の作成

作成した多重アライメントをもとに、近隣結合法で系統樹を作成する（図４）。まず、MEGA の最初の画面の”Phylogeny”メニューから”Construct/Test Neighbor-Joining Tree” を選択し、作成した MEGA 形式のファイルを選択する。

“Analysis Preference”画面が表示されるので、“Test Phylogeny”のドロップダウンメニューから“Bootstrap Method”を選択し、必要に応じてその下の”No. of rep.”の数値を入力する（検定を繰り返す回数のこと。通常 100 で構わない）。さらにその下の”Model/Method”のドロップダウンメニューから”Tajima-Nei”を選択する。入力が終わったら、一番下にある“Compute”をクリックする。解析が終わると、系統樹が表示される。

その画面上で系統樹の形態を変えたり、フォントなどの修正を加えることができる。そのままの形式で保存したい場合には”File”メニューの”Save Current Session”で保存できる。また”Image”メニューの”Copy to Clipboard”を選択することで、クリップボード経由でドロー系のソフトやパワーポイントに移動させ、発表用の作図を行うことも可能である。

（図４系統樹）



作成した系統樹からサブタイプの帰属が不明確だったり、枝の長さが異常に長いことがある。このような場合、塩基配列の読み直しが不十分だったり、多重アライメントの作成の時にレファレンス株の塩基配列との対応がずれていたりすることがあるので、確認する。もしこれらの問題が無ければ、

解析した領域に組換え点を持つサブタイプ間組換体である可能性があるので、続けて以下の解析を行う。

４-２-３．サブタイプ間組換え構造の解析

組換え構造を解析は、以下の４種類の方法で行う。(1)-(3)のデータ解析は Simplot（http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRoftware/ にてダウンロード可能）というソフトウェアを使って行うことができる。(4)は(1)-(3)の解析の結果、決定された組換え点の位置に基づいて、領域別に系統樹解析するもので、サブタイプ帰属を確認できるだけでなく、その起源を推定できる点で重要である。

①Similarity plot
②Bootscanning plot
③Informative site analysis
④Subregion tree analysis（領域別系統樹解析）

なお、前節にも述べたが、たとえ解析している領域に組換え点が含まれない場合の系統樹解析の結果においても、サブタイプ間組換え体である場合、既知のサブタイプあるいは CRF 標準株とは独立に進化を遂げたことにより、そのクラスターから独立した枝（branch）に位置することをしばしば経験しており、そのような場合組換え体の可能性があることを念頭におかれたい。系統樹解析は、それがたとえ比較的短い領域であっても、組換え体同定の最初の手がかりとなることを強調しておきたい。

図５に示した例では、系統樹解析（図５Ａ）で検体はサブタイプＣとクラスターを作っているが、アジアで収集された検体であるにもかかわらず、インドの流行株とはクラスターを形成せず外側に位置していた。サブタイプ間組換体である可能性を疑って解析を行った結果が図５(B) (Similarity plot) と (C) (Bootscanning plot) である。解析の結果、この検体はサブタイプＢとサブタイプＣの組換体であることが明らかになった。

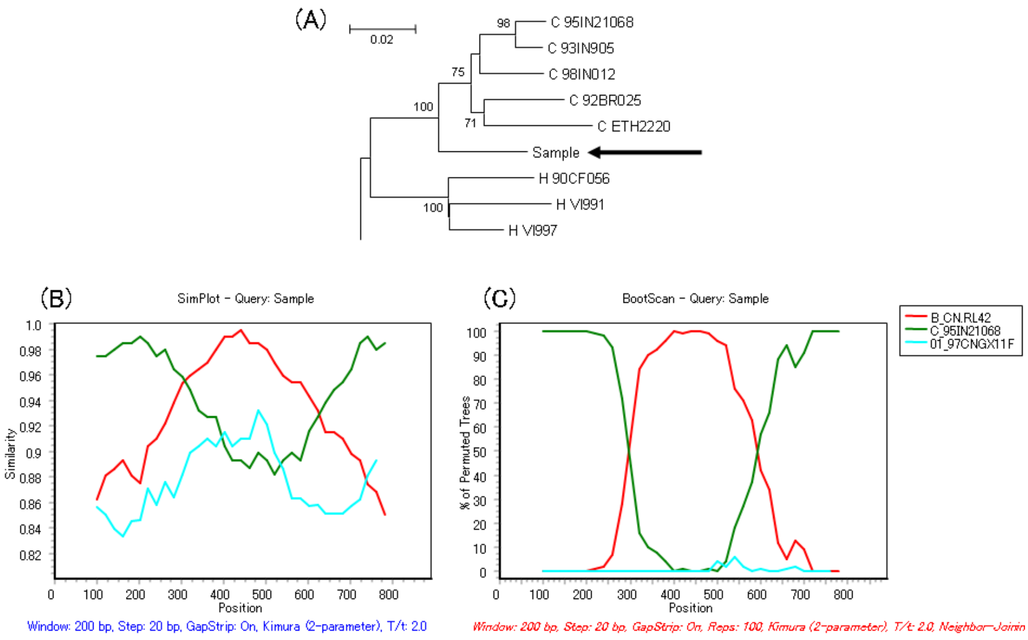
これらの解析は、Simplot（http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRoftware/ にてダウンロード可能）というソフトウェアを使って行うことができる。

解析を始める前に、必要な HIV-1 サブタイプのアライメントを FASTA 形式で作成しておく。各レファレンス株の名称の前に（A_xxx）のようにサブタイプ名をつけておくと、配列データを読み込んだ時にサブタイプを判別して表示してくれる。

Simplot を起動すると表示される”SeqPage”タブが選択されている状態で”File”メニューの”Open”を選択し、作成した FASTA 形式のファイルを開く。Similarity plot を行う場合には”Simplot”タブをクリックし、”Commands”メニューの”Query”で解析したいサンプル名を選択し、”Start Scan”ボタンをクリックすると解析結果を表示してくれる。Bootscanning plot を行う場合には”BootScan”タブをクリックし同様に Query を選択、”Start Bootscan” ボタンをクリックして解析を始める。

表示された結果は、”File”メニューで”Save as Metafile”を選択しいったん保存するか、”Edit”メニューで”Copy Metafile”を選択し、パワーポイントやドロー系のソフトにペーストすることによって移し、発表用の作図を行うことができる。

（図５組換え構造解析）



組換え点を同定するためには、上記の結果以外に informative site の情報が役に立つ。“SeqPage”の右下にある”For informative analysis”に、調べたい検体（Query）、組換え構造解析の結果得られたサブタイプの代表株（Ref1、2）、それ以外のサブタイプの株（Other）を入力し”FineSites”タブをクリックすると表示される。これらの情報を基に組換点の位置を同定することができる。組換え点の位置は、HXB2 ゲノムに対する相対的位置（HXB2 座標, HXB2 コーディネート）で表示するのが便利である、このようにして、様々な組換え体のもつ組換え点の相互関係・位置関係を比較分析することができる。組換え点は、ほとんど場合一点で表示できる訳ではなく、（informative site の間隔のため）原理的に遺伝子型帰属を決定できない不確定な幅があり、そのため、HXB2: xxxx-yyyy nt(あるいは xxxx ± zz nt)といった形で表示するのが厳密な方法である。

Subregion tree analysis (領域別系統樹解析)は、このようにして決定した座標値を利用して、１つのサブタイプに帰属する HIV ゲノム上のサブ領域に分け、各領域毎に系統樹を作成する方法で、先に述べたように、単にサブタイプ帰属を確定・確証することだけでなく、領域ごとの詳細な系統進化学的情報を得ることができる点で重要である。例えば、CRF01_AE に属するゲノム領域が、タイ型 CRF01_AE に由来するのかアフリカ型に由来するのかなど、より詳細な起源に関して考察の手掛かりが得られる。

４-３. HIV-2 ゲノムの検出とグループ同定

平成 14 年および 18 年に、外国において感染し国内で同定された HIV-2 感染症例を報告したが（文献１、２）、平成 21 年、愛知県における５例の HIV-2 感染症例が報告された（文献３、４）。うち３例は来日中のアフリカ系外国人男性であったが、残り２例は日本人女性で、国内においてアフリカ系外国人男性との性交渉によって感染したと推定される（文献３、４）。今後も HIV-2 感染症例が増える可能性が否定できない。

これらの症例についてはすでに厚生労働省より健康危険情報が出されており（文献５、６、７）、HIV-2 感染例を念頭に置いた検査体制が取られている。HIV-2 検出に関しては、血清学的な検査が何よりもまず重要である。HIV-2 の血清学的検査・同定の手順に関しては、前節を参照されたい。

系統解析の手法は、HIV-1 のサブタイプ・サブタイプ間組換体同定の項目で紹介した方法をそのまま用いることができる。表２に、国内で同定された HIV-2 感染例の血漿または PBMC 検体からグループを同定するために用いられたプライマーを示す。

（表２HIV-2 グループを同定するためのプライマー）

gag			env		
ID	プライマーの配列	SIV_{MM}	ID	プライマーの配列	SIV_{MM}
(Ibe ら、文献４)					
RT-PCR					
gagA	5'-AGG TTA CGG CCC GGC GGA AAG AAA A-3'	1110-1134	PFD1	5'-GGT CTA TTW CAG AGA AGG CAG-3'	5200-5220
gagB	5'-CCT ACT CCC TGA CAG GCC GTC AGC ATT TCT TC-3'	2116-2085	LTR9574	5'-TGG TGA GAG TCT AGC AGG G-3'	10074-10056
2nd PCR					
gagC	5'-AGT ACA TGT TAA AAC ATG TAG TAT GGG C-3'	1135-1162	EB2	5'-TCA TGT GAY AAR CAY TAT TGG G-3'	7258-7279
gagF	5'-CCT TAA GCT TTT GTA GAA TCT ATC TAC AT'	1970-1941	EB5	5'-CTC CTC TGC AGT TAG TCC AC-3'	7795-7776
(Kusagawa, Takebe ら)					
RT-PCR					
2_005A	5'-TGG GAG ATG GGC GCG AGA AAC TCC GTC-3'	1047-1073	2-051A	5'-CCC GGA CTT TAC TGG CTG GGA TAG TGC-3'	8264-8290
2_055BB	5'-TGC AGC CTT CTG AGA GTG CCT G-3'	1596-1575	2-052B	5'-GAG AAT ACT GGC CTA TAG CCC TT-3'	8780-8758
2nd PCR					
2_007AA	5'-AGG GAA GAA AGC AGA TGA ATT AGA A -3'	1079-1103	2-053A	5'-CCG TCT GGG GAA CGA AAA ACC TCC AG-3'	8348-8373
2_056BB	5'-AAT CCT GGC ACT ACT TCT GCC CC-3'	1573-1551	2-054B	5'-CTT CTG TTT CTT CGT TGG CTG GC-3'	8832-8854

参考文献

1. Kusagawa S., Imamura Y., Yasuoka A., Oka S., Takebe Y.　Identification of HIV type 2 subtype B transmission in East Asia.　AIDS Res Hum Retroviruses 19:1045-1049 (2003)
2. Utsumi T., Nagakawa H., Uenishi R., Kusagawa S., Takebe Y.　An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years.　AIDS 21:1834-1835 (2007)
3.永川博義、内海孝信，草川　茂、武部　豊　日本人症例としてはじめての HIV-2 感染例（注: 遺伝学的確定症例）の同定. IASR 27:343 (2006)
4. 伊部史朗、横幕能行、杉浦亙　本邦における HIV-2 の疫学動向と新たな組換え流行株 (CRF01_AB) の同定　IASR 31:232-233 (2010)
5. Ibe S., Yokomaku Y., Shiino T., Tanaka R., Hattori J., Fujisaki S., Iwatani Y., Mamiya N., Utsumi M., Kato S., Hamaguchi M. and Sugiura W.　HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2.　J Acquir Immune Defic Syndr 54:241-247 (2010)
6. 健疾発第 1024001 号：医療機関および保健所に対する HIV-2 感染症例の周知について
7. 健疾発第 0811001 号：医療機関および保健所に対する HIV-2 感染症例の周知について
8. 健疾発第 0203001 号：医療機関および保健所に対する HIV-2 感染症例の周知について

５. HIV-1 RNA 定量法（KK-TaqMan 法）

５－１． 背景

HIV-1 RNA 定量法は、HIV-1 感染者のフォローアップ検査として薬剤治療効果の判定、病態把握等に重要な検査であるが、HIV-1 RNA 定量法を確定診断に使用することで HIV-1 感染をより早期に診断することが可能になった。我が国では、HIV-1 RNA 定量検査法としてロシュ・ダイアグノスティックス社（以下、ロシュ社）のアンプリコア HIV-1 モニター（以下、アンプリコア）が長期間使用されてきたが、2008 年 4 月頃から、同じロシュ社のリアルタイム PCR を原理とするコバス TaqMan HIV-1（以下、コバス TaqMan）が販売されるようになった。その後、同じリアルタイム PCR を原理とするアキュジーン m-HIV-1（アボット社）が販売されている。これらはアンプリコアに比べ自動化が進み、定量範囲が広いなどの特徴があるが、2 法とも高価な専用装置が必要であるため、多くの公的検査・研究機関において導入が困難となっている。

本項では HIV 検査体制研究班（厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業）で開発した汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1 RNA 定量法である KK-TaqMan 法を記載する。

５－２． KK-TaqMan 法の概要

本法は汎用のリアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1RNA 定量法で、定量下限は 50 コピー/mL、定量範囲は 50～500,000 コピー/mL で、市販のキットに比べ狭いが、検体を希釈することによって 500,000 コピー/mL 以上の定量も可能である。なお、本法は主としてアプライドバイオシステムズ（ABI）のリアルタイム PCR 装置 7900HT と StepOnePlus で基礎的検討を行ったが、ABI の 7500、ロシュの Light Cycler 480 も使用可能であることを確認している。しかし、使用する装置、試薬、反応容器等により最適な反応条件が異なるため、本法導入の際には、施設毎に必ず条件検討を行う必要がある。

本法のターゲット領域は gag p24 領域で、Los Alamos HIV データベースによる検索を行い、HIV-1 グループ M のサブタイプおよび CRF に対応できるように数カ所の塩基を degenerate（縮重）したプライマー、プローブを用いている。本法はサブタイプ B、A、C、D、F、G、CRF01_AE について良好な反応性を示し、コバス TaqMan との相関も良好であった [1,2]。

５－３． KK-TaqMan 法プロトコール

（１）検査材料

血漿（抗凝固剤は EDTA、あるいは CPD が推奨される。ヘパリンは PCR を阻害するため、使用不可）または血清の 500μL を用いる。

（２）スタンダード HIV-1RNA 希釈系列の作製

スタンダードとして HIV-1 cell line 8E5 培養上清を用いる。KK-TaqMan 法導入施設には既知濃度の培養上清を配布する（連絡先：神奈川県衛生研究所）。8E5 培養上清中の HIV-1 粒子は、逆転写酵素とインテグラーゼが欠損しているため感染性がなく、カテゴリーは Biosafety level 2 である（http://www.atcc.org）。

市販血清（三光純薬, SC1318 EXA Liquid 3 Normal）を用いて、8E5 培養上清の希釈系列 500,000、50,000、5,000、500、150、50 コピー/mL を作製する。各希釈系列は 1.5mL チューブに 500μL ずつ分注し、使用時まで-80℃で保存する。

標準曲線は 500,000、5,000、150 ｺﾋﾟｰ/mL の 3 点を用いて作製し、高濃度、中濃度、低濃度コントロールとして 50000、500、50 ｺﾋﾟｰ/mL を、陰性コントロールとして希釈用血清を用いる。

（３）ウイルス RNA の抽出

RNA 抽出キット：QIAamp UltraSens Virus Kit （QIAGEN、No.53704）
使用機器：微量高速冷却遠心機、高温槽（1.5ml チューブ用）
使用器材：1.5mL チューブ、先細トランスファースポイト、
マイクロピペット、フィルター付きチップ（1000P、200P、20P）

【操作フロー】
（a）サンプルの前処理とスピンカラム法による RNA 抽出

サンプル、スタンダード、陽性および陰性コントロール、各 500 µL を
1.5mL チューブに準備する。
↓
4℃、15,000 rpm、1 時間、遠心する。
（1.5mL チューブに印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する。）
↓
上清を約 20 µL 残して除去
（先細スポイトを使用し、沈殿を除去しないように注意する。）
↓
15,000 rpm、5 分間遠心し、ピペットチップ（20 µL 用）で血清を完全に除去する
↓
Buffer AR 300 µL×検体数×1.1 を 60℃で温めておき、使用直前に
Protease K 20 µL×検体数×1.1 を加え、よく撹拌する。
↓
Buffer AR と Protease　K の混合液を各チューブに 320 µL 加える。
蓋に carrier RNA を 5.6 µL 入れ、2～3 回転倒混和後、vortex する。
↓
5 秒間 vortex を 3 回～5 回（ペレットが再懸濁するまでよく混ぜる）
↓
スピンダウン
↓
40℃の恒温槽で 10 分間反応する。
5 分後、5 秒間 vortex を 2 回
10 分後、5 秒間 vortex を 3 回
↓
スピンダウン
↓
Buffer AB 300 µL、10 秒間 vortex
↓
スピンカラムをコレクションチューブにセットし、反応液を全量スピンカラムに移し、
6,000 rpm、1 分間遠心する
↓
スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、スピンカラムに AW1 を
500 µL 加え、8,000 rpm、1 分間遠心する。
↓
スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、スピンカラムに AW2 を
500 µL 加え、14,000 rpm、3 分間遠心する。
↓
（スピンカラムの縁に濾液がついたら、新しいコレクションチューブを用いて、
14,000 rpm、1 分間遠心し、完全に濾液を除く。）
↓
スピンカラムを 1.5ml チューブに設置し、AVE を 30 µL 加え、8,000 rpm、
1 分間遠心する。（この操作を 2 回繰り返す、計 60 µL）

（b）エタノール沈殿による RNA 濃縮

60 µL 溶出液
↓
3 M 酢酸ナトリウム 6 µL, エタノール 200 µL を（検体数×1.1）分作ってお
き、各チューブに 200 µL ずつ加え、5 秒間 vortex する。
↓
4℃、15,000 rpm、10 分間遠心する。

（チューブに印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する）

↓

先細トランスファースポイトで上清を除去する。

（沈殿を除去しないように注意）

↓

70％エタノール 100 µL を加え、5 秒間 vortex する。

↓

4℃、15,000 rpm、2 分間遠心する。

（チューブの背に印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する）

↓

上清を除去し、蓋を開けたまま、安全キャビネット内で約 10 分間放置し、
エタノールを蒸発させる。

↓

氷冷したリアルタイム RT-PCR 用 Master mixture*[1] を 50 µL、あるいは
20 µL 加え、10 秒間 vortex、スピンダウン後、反応液を氷上のリアルタイム
プレートへ移す。

（*1.　使用するリアルタイム PCR 装置によって液量が異なる。次項（４）を参照）

（４）　リアルタイム RT-PCR

試薬：PCR 装置によりどちらかを選択する。

- SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen, No.11745-100)
- EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR Kits (Universal ROX) , （Invitrogen, No11791-200）

プライマー、プローブ（HPLC 精製）:

・deSK145：　5'-AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATGCARAT-3'

・deSKCC1B:　5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACTTCC-3'

・deKK-MGB-probe：　5'末端側に FAM、3'末端側に MGB を修飾
5'-ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA-3'

①　リアルタイム装置 ABI 7900HT；スタンダードモード

試薬：　SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System with ROX

Master mixture[*1]

2×Reaction Mix with ROX	25.0	µL
20 µM deSK145	1.25	µL
20 µM deSKCC1B	1.25	µL
5 µM deKK-MGB	2.0	µL
Water	19.5	µL
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	1.0	µL
Total	50.0	µL

②　リアルタイム装置 ABI Step One plus; スタンダードモード

試薬：　EXPRESS One Step SuperScript qRT-PCR Kits (Universal ROX)

Master mixture*[1]

Express qPCR SuperMix with Premixed ROX	10.0 µL
10 µM deSK145	1.0 µL
10 µMdeSKCC1B	1.0 µL
4 µM deKK-MGB	1.0 µL
Water	5.0µL
Express SuperScript Mix for One-Step qPCR	2.0 µL
Total	20.0µL

③　RT-PCR 条件　（ 1)、2）とも同じ条件）

50℃、15 分
95℃、2 分
95℃、15 秒 ⎫
60℃、1 分 ⎭ 40 cycles

（５） 結果の解釈と判定

反応終了後は標準曲線を作成し、slope 値が－3.80（増幅効率 91.5％）～－3.32（増幅効率 : 100％）の範囲であることを確認する。

増幅サイクルの終盤で、非特異反応による TaqMan probe の分解が起きることがある。増幅サイクル終盤にシグナルが認められた場合、必ず増幅曲線を確認し、特異的な増幅カーブであるか否か確認する。

(1) HIV-1 抗体陰性の場合

- シグナルが検出されない場合は HIV-1 陰性と判定する。
- 測定値が 50 コピー/ mL 未満で、特異的な増幅カーブが認められた場合は再検査する。再検査でシグナルが検出されない場合は陰性と判定し、特異的な増幅カーブが認められた場合は、1 週間後の再検査を勧める。
- 測定値が 50 コピー/ mL 以上で、特異的な増幅カーブが認められる場合は、感染初期と判定する。WB 法陽性までフォローアップすることが望ましい。

(2) HIV-1 抗体陽性の場合

- 測定値が 50 コピー/mL 未満、あるいはシグナルが検出されない場合、<50 ｺﾋﾟｰ/mL と表し、50 コピー/mL 以上の場合は、測定値をそのまま記載する。

（６）留意事項

リアルタイム PCR 法は高感度の検査法であるため、コンタミネーションは大きな元凶となるので、作業動線を考慮した PCR に適した作業環境を確保し、作業時には作業フローをしっかりと確認することが重要である。特に HIV 陽性検体を取り扱った後は、次亜塩素酸ナトリウム希釈液や DNA Away（Molecular BioProducts,#7010）等で実験台や使用器具等のクリーニングを行う等、コンタミネーションによる偽判定をしないように細心の注意を払わなければならない。

５－４． 参考文献

1. Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. J. Virol. Methods. 157 (2): 141-146 (2009).
2. 近藤真規子、加藤真吾他：汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1 RNA 定量法の開発、厚生労働科学研究補助金エイズ対策研究事業「HIV 検査相談機会の拡大と質的研究に関する研究」平成 18～20 年度総合研究報告書、p302-312 (2009).

６． HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法

６－１．背景

1997 年に HIV 感染症の標準的な治療方法として導入された３剤以上の抗 HIV-1 薬を組み合わせて使用する多剤併用療法(combination Antiretroviral Therapy: cART)は優れた治療効果を示し HIV 感染症の予後を大きく改善した。しかし治療の成功には様々な障害が立ちふさがっている。低いアドヒアランス、治療薬剤による副作用、そして薬剤耐性ウイルスの出現等いずれも治療の失敗の引き金になる事項である。特に薬剤耐性ウイルスの出現はその後の薬剤選択に大きな制約を課すことから重要な問題である。

症例が薬剤耐性に陥っているか否かは臨床経過からある程度は判断することが出来る。しかし、より詳細にどの薬剤に対して耐性を獲得し、どの薬剤に対しては感受性が温存され薬効が期待できるかを判断するには特別な検査を実施する必要がある。遺伝子検査はその名が示すようにウイルス遺伝子の配列を調べることにより耐性の有無を調べる検査であり、この検査が成立する前提として各治療薬剤が耐性を呈する特異的な変異を選択するという事実がある。従って誘導された変異の有無を調べることにより薬剤耐性の判定が可能となる。

６－２． 検査の概要

HIV-1 の薬剤耐性検査は患者血漿中のウイルスより RNA を抽出し、それをテンプレートにして逆転写反応を行い、antisense DNA を作り出すことから始まる。次にこの DNA 鎖を鋳型にして PCR を行い塩基配列解析が可能な量まで DNA を増幅する。塩基配列解析はサンガー法を応用したシークエンス反応を行うのが今日普及している。反応後の産物は自動塩基配列解析装置で解析され、結果はアミノ酸に翻訳後、リファレンス配列（感受性株、通常は HXB2 を使用する）と比較し、耐性変異の有無を確認する。

６－３． 検査プロトコール

1. 採血

採血時の抗凝固剤は EDTA が望ましい。ヘパリンは PCR 反応を阻害するので原則避けるべきである。検査には 200-500 μL の血漿が必要である。採血後は出来るだけ早く細胞成分と血漿成分とを分けるのが望ましい。処理するまでに時間がかかるようであれば、<u>室温</u>で保管する。

2. 血漿中ウイルスからの RNA 抽出

薬剤耐性遺伝子検査は血漿中の HIV-1 粒子より抽出したウイルス RNA を用いるのが一般的である。検査に際しては RNA を取り扱う際の一般的な注意事項を守るとともに、検体のコンタミネーションを防ぐためのエリア分けが必要である。以下複数の RNA 抽出キットが市販されており、基本的にどれを用いても良い。以下代表的な手技について記す。

(1) RNA 吸着カラムを用いた手法 （スピンカラム法）

この手法は簡便であり、迅速にきわめて純度の高い RNA を得ることができる。ここでは QIAamp Viral RNA Mini Kit [QIAGEN; 52904] を用いた方法と、High Pure Viral RNA Kit [Roche; 1858882] を用いた方法を説明する。

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた方法

1. 血清または血漿サンプル 140 μL に対して 560 μL の buffer AVL を加え、転倒混和にてよく混合する。
2. 室温（15～25℃）で 10 分間インキュベートする。
3. 数秒間遠心してサンプルをスピンダウンする。
4. サンプルに 560 μL のエタノールを加え、転倒混和にてよく混合したのち、数秒間遠心してサンプルをスピンダウンする。
5. QIAamp スピンカラムにサンプル 630 μL を注入し、8,000rpm (ca. 6,000 xg) で 1 分間遠心する。QIAamp スピンカラムを新しい 2mL チューブに移す。濾液が入った 2mL チューブは捨てる。
6. Step 5 をもう一度行う。

7. QIAamp スピンカラムに 500 μL の Buffer AW1 を加え、8,000rpm（ca. 6,000 g）で 1 分間遠心する。QIAamp スピンカラムを新しい 2 mL チューブに移す。濾液が入った 2 mL チューブは捨てる。
8. QIAamp スピンカラムに 500μL の Buffer AW2 を加え、14,000rpm（ca. 20,000 g）で 1 分間遠心する。
9. 濾液を除去し、2mL チューブに QIAamp スピンカラムをセットし、14,000rpm（ca. 20,000 g）で 1 分間遠心する。
10. QIAamp スピンカラムを新しい 1.5 mL チューブに移す。60 μL の Buffer AVE を加え、室温で 1 分間インキュベートした後、8,000rpm（ca. 6,000 g）で 1 分間遠心する。なお、Buffer AVE は QIAamp スピンカラムの管壁に付かないように、フィルターに直接滴下すること。

High Pure Viral RNA Kit を用いた方法
1. 血清または血漿サンプル 0.2 mL に対して 0.4 mL （2 倍量）の binding buffer （緑 cap） を加え、ピペッティングしてよく混ぜる。
2. コレクションチューブにセットしたスピンカラムへ混合したサンプルを添加し、10,000rpm (ca. 8,000 g）で 10～20 秒遠心する（この操作により、ウイルス RNA はスピンカラムのフィルターにトラップされる)。
3. スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、inhibitor removal buffer （黒 cap）を 0.4 mL 加え、10,000rpm で 10～20 秒遠心する。
4. スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、wash buffer （青 cap） を 0.4 mL 加え、10,000rpm で 10～20 秒遠心する。
5. スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、wash buffer を 0.4 mL 加え、10,000rpm で 1 分遠心して wash buffer をフィルター内より完全に取り除く。
6. スピンカラムをきれいなチューブに移し、elution buffer（白 cap）を 100 μL 加え、10,000rpm で 1 分遠心してフィルター内にトラップされた RNA を回収する。

(2) 液層分離 （フェノール GTC） 法［TRIZOL-LS；Invitrogen；10296-010］

この方法でも純度の高い RNA を回収することが可能である。
1. 血清または血奨サンプル 0.25mL に 0.75mL （3 倍量） の TRIZOL-LS を加えて、転倒混和またはピペッティングでよく混ぜた後、室温で 5 分放置する。
2. クロロホルムを 0.2mL 加え、しっかりフタを閉めて転倒混和でよく混ぜ、室温で 2～15 分程度放置する。
3. 15,000rpm、10 分遠心する。
4. RNA を含んだ無色の上（水）層を採取し、新しいチューブに移す。
5. 0.1mg の tRNA（tRNA yeast；Invitrogen；16051-039）と 0.5 mL のイソプロパノールを加え、-20 ℃で約 1 時間冷やす。
6. 4 ℃、15,000rpm で 10 分間遠心する。
7. 上清を捨て 80％エタノールでペレットを洗浄する。
8. ペレットを風乾し 50 μL の RNase free water に溶解する。
9. 55～60℃で 10 分加熱する。

3. 治療薬剤の標的であるプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ遺伝子および、サブタイプ判定に必要な *gag*, *env* 遺伝子領域の増幅 （RT-PCR から nested PCR）

プロテアーゼ（1～99 番アミノ酸）と逆転写酵素（1～240 番アミノ酸まで）遺伝子については、両遺伝子を 1 断片で増幅する方法と、2 断片に分けて増幅する方法がある。各領域の増幅に用いるプライマーおよび、得られる断片の大きさを表 1 および図 1 に記す。

今日多種の RT-PCR 反応キットが販売されており、いずれを用いても問題なく増幅することができるが、fidelity の高いものを選ぶことを薦める。ここでは、SuperScript One-Step RT-PCR for Long Templates［Invitrogen；11922-028］を用いた方法と、Takara One Step RNA PCR Kit (AMV)［Takara；RR024A］を用いた方法を例として挙げる。下記のレシピに従い反応液を準備する。

(1) SuperScript One-Step RT-PCR for Long Templatesを用いた方法（1反応液分）

2x Reaction Mix	12.5 µL	
for. primer (10 µM)	0.75µL	(Final conc. 0.3 µM)
rev. primer (10 µM)	0.75µL	(Final conc. 0.3 µM)
RNase free water	5.5 µL	
RT/Platinum Taq HiFi Mix	0.5 µL	
Template RNA*	5.0 µL	
Total volume	25.0 µL	

*Negative control用には、template RNAの代わりに、RNase free waterを添加する。

反応液の調整はミスアニーリングを防ぐために氷上で行う。準備が出来たらRT-PCRを行う。
次にプログラムを参考に示す。

逆転写反応	50 ℃	30 min	
	94 ℃	2 min	
PCR	94 ℃	15 sec	x 40 cycles
	50 ℃	30 sec	
	68 ℃	2 min	

(2) Takara One Step RNA PCR Kit (AMV) を用いた方法（1反応液分）

RNase free water	17.5 µL	
10x AMV RT-PCR buffer	5.0 µL	
25mM $MgCl_2$	10.0 µL	(5 mM)
10mM dNTPs	5.0 µL	(1 mM)
for. primer (100 µM)	0.5 µL	(50 pmol)
rev. primer (100 µM)	0.5 µL	(50 pmol)
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0.5 µL	(20 U)
AMV RTase XL (5 U/µl)	0.5 µL	(2.5 U)
AMV-Optimized Taq (5 U/µl)	0.5 µL	(2.5 U)
Template RNA*	10.0 µL	
Total volume	50.0 µL	

*Negative control用には、template RNAの代わりに、RNase free waterを添加する。

反応液の調整はミスアニーリングを防ぐために氷上で行う。準備が出来たらRT-PCRを行う。
次にプログラムを参考に示す。

逆転写反応	55 ℃	20 min	
	95 ℃	2 min	
PCR	95 ℃	10 sec	x 40 cycles
	52 ℃	5 sec	
	72 ℃	45 sec	

引き続きnested PCRを行う。ここでは、TaKaLa LA Taq ［TaKaLa; RR002A］を用いた方法、KOD DNA polymerase [TOYOBO; KOD-101]を用いた方法、Hot Start Ex Taq [TAKARA; RR006A] を用いた方法を例としてあげる。下記のレシピに従い反応液を準備する。

(1) TaKaLa LA Taqを用いた方法（1反応液分）

10x LA PCR buffer II	2.5 µL
25 mM $MgCl_2$	2.5 µL

dNTP mixture (各 2.5 mM)	4.0 μL	
for. primer (10 μM)	1.25μL	(Final conc. 0.5 μM)
rev. primer (10 μM)	1.25μL	(Final conc. 0.5 μM)
Nuclease free water	12.75μL	
TaKaRa LA Taq (5 U/μl)	0.25μL	
RT-PCR product	0.5 μL	
Total volume	25.0 μL	

反応液の準備が出来たら下記プログラムで PCR を行う。

94 ℃	3 min.	
94 ℃	15 sec.	x 40 cycles
50 ℃	30 sec.	x 40 cycles
70 ℃	2 min.	x 40 cycles

(2) KOD DNA polymerase を用いた方法 (1 反応液分)

Nuclease free water	33.0 μL	
10x KOD buffer (#1)	5.0 μL	
25mM $MgCl_2$	2.0 μL	(1 mM)
2mM dNTPs	5.0 μL	(0.2 mM)
for. Primer (100 μM)	0.4 μL	(40 pmol)
rev. primer (100 μM)	0.4 μL	(40 pmol)
KOD (2.5 U/μl)	0.4 μL	(1.0 U)
RT-PCR product	3.8 μL	
Total volume	50.0 μL	

94 ℃	15 sec.	
94 ℃	5 sec.	x 30 cycles
60 ℃	3 sec.	x 30 cycles
74 ℃	5 sec.	x 30 cycles
(72 ℃	7 min.)	

(3) Hot Start Ex Taq を用いた方法 (1 反応液分)

Nuclease free water	36.0 μL
10x Ex Taq buffer	5.0 μL
dNTP mixture (各 2.5 mM)	4.0 μL
for. primer (100 μM)	0.5 μL
rev. primer (100 μM)	0.5 μL
TaKaRa Ex TaqHS (5 U/μl)	0.5 μL
RT-PCR product	3.5 μL
Total	50.0 μL

98 ℃	15 sec.	
98 ℃	10 sec.	x 30 cycles
60 ℃	30 sec.	x 30 cycles
72 ℃	60 sec.	x 30 cycles
(72 ℃	7 min.)	

4. PCR 産物の精製

反応が終了したら反応液中に残っているタンパク質、プライマー、未反応 dNTPs などを取り除かなければならない。精製方法は多種あり、ここでは QIAquick Gel Extraction kit[QIAGEN ; 28704]に

よる精製法、QIAquick PCR purification kit [QIAGEN; 28104] による精製法を記す。

(1) QIAquick Gel Extraction kit を用いた精製法

１．　PCR 反応液に 3 倍量の buffer QG を加えて混ぜる。

２．　１．に PCR 反応液の 1 倍量の isopropanol を加えて混ぜる。

３．　サンプルをスピンカラムに添加し、13,000rpm で 1 min 遠心する。

４．　コレクションチューブ中の濾液を除去し、スピンカラムをセットし、buffer PE を 650µL 加えた後 13,000rpm で 1 min 遠心する。

５．　コレクションチューブ中の濾液を除去し、スピンカラムをセットし、13,000rpm で 1 min 遠心する。

６．　スピンカラムを 1.5 mL の eppendorf チューブにセットする。

７．　Buffer EB、H_2O 或いは TE を 50µL 添加し、1 min インキュベートした後に 13,000rpm で 1 min 遠心して DNA を回収する。

（２） QIAquick PCR purification kit を用いた精製法

1. PCR 産物に 5 倍量の buffer PB を加えてよく混ぜる。
2. スピンカラムをコレクションチューブ（フタなし 2 mL tube）にセットする。
3. サンプルをカラムに添加し 14,000rpm で 30 秒遠心する。
4. スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、buffer PE を 0.75 mL 加え 14,000rpm で 30 秒遠心する。
5. スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、14,000rpm で 30 秒遠心してエタノールをフィルターから完全に取り除く。
6. スピンカラムを 1.5 mL の遠心チューブへ移す。
7. 適当量（50～400µL）の buffer EB または H_2O あるいは TE を加えて 14,000rpm で 30 秒遠心して DNA を回収する。

5. 増幅した PCR 産物の塩基配列解析

(a) シークエンス反応

以下に蛍光色素標識 ddNTP による dye-terminator 法によるシークエンス反応を記す。

蛍光標識 ddNTP 試薬は各種販売されており、同時に解析できる色素の種類が異なるだけで基本的な取り扱いは同じである。ここでは BigDye terminator v3.1 [Applied Biosystems] によるサイクルシークエンスを記す。

Nuclease free water	8.0 µL
BigDye terminator v3.1	3.0 µL
5x sequencing buffer	3.0 µL
Primer (1μM)*	3.0 µL (3 pmol)
PCR product	3.0 µL (30-90 ng)
Total volume	20.0 µL

*解析プライマーに関しては表 1 を参照

反応は次の条件で行う

96℃	15 sec.	
96℃	10 sec.	x 25 cycles
60℃	50 sec.	

(b) シークエンス反応産物の精製

反応後に残った酵素、dNTPs、labeled-ddNTPs 等を除去しシークエンサーにアプライできる状態にする。ここでは AutoSeq G-50 スピンカラム [GE Healthcare; 27-5340] および BigDye X-Terminator

[Applied Biosystems; 4376486] を用いた精製法を説明する。

AutoSeq G-50 スピンカラム

1. レジン充填済みのカラムに 100mM EDTA (pH8.0) を 10 µL 添加して vortex で懸濁する。
2. 上部のキャップを 1/4 回転くらい回して緩め、下部の流出口を折りとる。
3. カラムを 1.5 mL チューブにセットして 4,600rpm で 1 分間遠心し、余分な水を除く。
4. カラムを新しい 1.5 mL チューブに移して、反応済みサンプルをカラムに添加し、4,600rpm で 1 分間遠心してサンプルを溶出する。
5. 必要ならば、ヒートブロックまたは減圧遠心乾燥機 (speed vac) 等でドライアップ後、専用の loading buffer*に懸濁する。

*loading buffer (ポリアクリルアミドゲル用)
(formamide: 25 mM EDTA (pH8.0) / blue dextran (50 mg/mL) = 5:1)
(ABI 377 等のポリアクリルアミドゲルで泳動する場合と ABI 310 等のキャピラリーでは異なる)
シークエンサーの準備ができたらサンプルを添加、泳動する。

BigDye X-Terminator

1. シークエンス反応液 20 µL に、SAM 溶液 90 µL と BigDye X-Terminator 溶液 20 µL を添加する。
2. ボルテックスミキサーの目盛りを最大にして 30 分間撹拌する。
3. 1000 g で 2 分間遠心する。
4. シークエンサーへセットして泳動する。

6. 薬剤耐性の診断と評価

精製したシークエンス反応産物の塩基配列をシーケンサーにて解析後、アミノ酸に翻訳し薬剤耐性変異の有無を判定する。薬剤耐性を呈する変異は薬剤ごとに決まっており、その対応関係を以下にまとめた。表に示す通り、同じクラスの薬剤の間では変異を共通するものがあり、交叉耐性の原因となっている。表 2 は本マニュアル執筆時点の情報であり、研究の進展とともに薬剤耐性変異のパターンは常に更新されており、最新の情報については IAS-USA の HP (http://www.iasusa.org/) や Stanford 大学の HP (http://hivdb.stanford.edu/) を参照することを進める。

核酸系逆転写酵素阻害剤 (nucleos(t)ide analogue RT inhibitor:NRTI)

テノフォビル　tenofovir (TDF)
高度耐性：　(1)K65R
　(2)T69ins + T215Y + (M41L, A62V, K70R, L210W の内少なくとも 2 つ)
中度耐性：　(1)T69S

ラミブジン　lamivudine (3TC)
エムトリシタビン　Emtricitabine (FTC) (商品名：エムトリバ)
高度耐性：　(1)M184V/I
　(2)T69ins + T215Y + (M41L, A62V, K70R, L210W の内少なくとも 2 つ)
中度耐性：　(1)T69ins + T215Y
軽度耐性：　(1)E44D/A + V118I
　(2)Q151M complex
　(3)K70E
　(4)T69ins

アバカビル　abacabir (ABC)
高度耐性：　(1)M41L + D67N + L74V + M184V/I + L210W + T215Y/F
　(2)Q151M + F77L + (A62V, V75I, F116Y の内少なくとも 1 つ)
　(3)T69ins + T215Y + (M41L, A62V, K70R, L210W の内少なくとも 2 つ)
中度耐性：　(1)M184V + (K65R, L74V, Y115F の内 2 つ以上)
　(2)T69ins + T215Y

(3)Q151M + F77L
軽度耐性： (1)M41L + E44D + D67N + L210W + T215Y/F
(2)M41L + D67N + V118I + L210W + T215Y/F
(3)M41L + D67N + L210W + T215Y/F
(4)Q151M complex
(5)T69ins

非核酸系逆転写酵素阻害剤（non-nucleoside RT inhibitor:NNRTI）
エファビレンツ Efavirenz (EFV)
高度耐性： (1)L100I, K103N, V106M, Y188L, G190C/Q/T/S の内少なくとも 1 つ
軽度耐性： (1)G190E, M230L

エトラビリン etravirine (ETV)
中～高度耐性： (1)V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/Tの内4個以上の集積
(2)Y181C/I, G190A/S, M230L
(3)L100I + K103N + Y181C
(4)V179F + Y181C
(5)Y181C + H221Y
(6)Y181V
軽度耐性: (1)L100I, V179F/I, Y181C, G190F, M230L, Y318F の内少なくとも 1 つ

プロテアーゼ阻害剤（protease inhibitor:PI）
アタザナビル atazanavir (ATV)
中～高度耐性： (1)L10I/V/F, K20R/M/I, L24I, L33I/F/V, M36I/L/V, M46I/L, G48V, 154V/L, L63P, A7IV/T/I, G73C/S/T/A, V82A/F/S/T, I84V, L90M の内 5 個以上の集積

ロピナビル lopinavir (LPV)
中～高度耐性： (1)(I50V, I54A/M/S/T/V, V82A/F/S の内いずれか 1 つ) + (L10F/I, GI6E, K20I/M, V32I, L33F, E34Q, K43T, M46I/L, I47V, G48M/V, I50V, I54A/M/S/T/V, Q58E, L63T, G73T, T74S, V82A1F/S, L89I/M の内 5 個以上の集積)
(2) L10F/I, G16E, K20I/M, V32I, L33F, E34Q, K43T, M46I/L, I47V, G48M/V, I50V, I54A/M/S/T/V, Q58E, L63T, G73T, T74S, V82A/F/S, L89I/M の内 7 個以上の集積

ダルナビル darunavir (DRV)
中～高度耐性： (1)I50VもしくはV32I + I47V
(2)I50V + I54L + L76V
(3)L33F + I54M +I47V + T74P + I84V
(4)V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V の内 4 個以上の集積
軽度耐性： (1)V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V の内 3 個以上の集積
インテグラーゼ阻害剤（Integrase Strand Transfer Inhibitor:INSTI）
ラルテグラビル raltegravir
高度耐性： (1)Y143C/H/R
(2)G140S+Q148R/H/K
(3)N155H

7.薬剤耐性遺伝子検査推奨事例
薬剤耐性遺伝子検査の実施が望ましい事例は以下のとおりである。

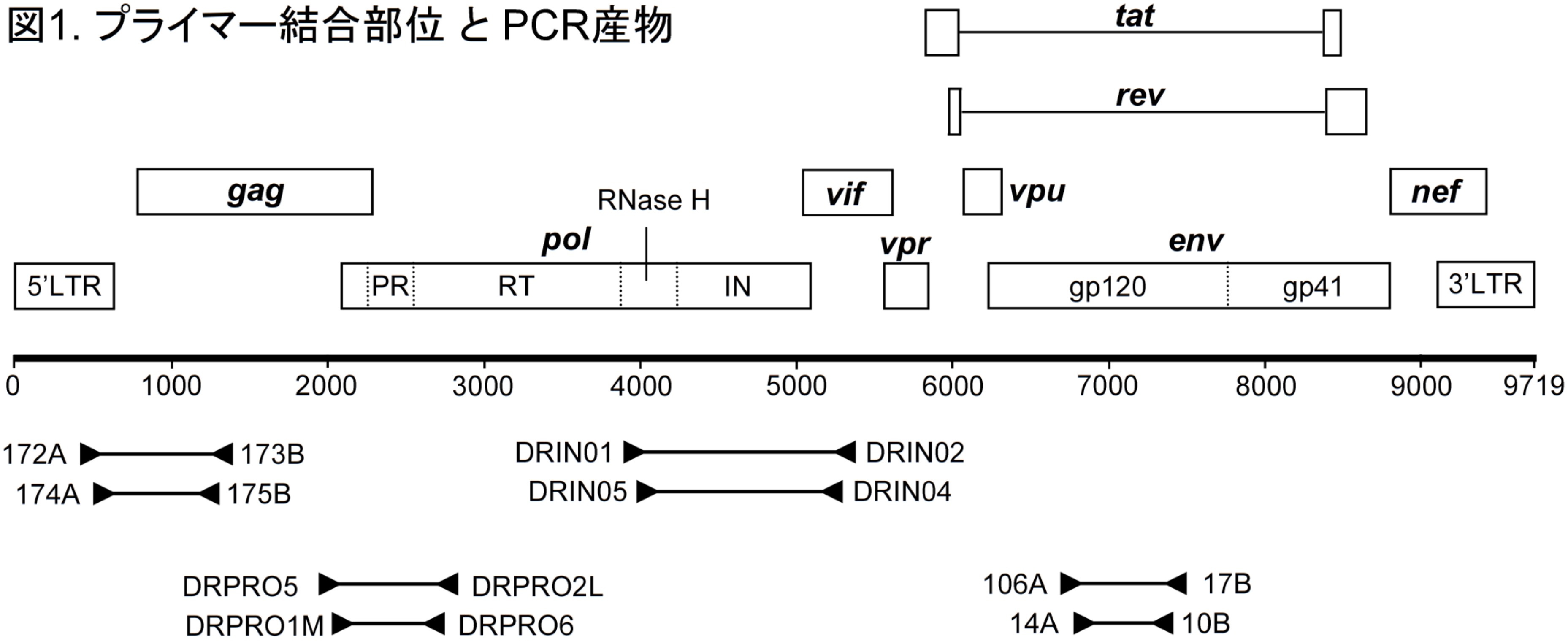
(1) HIV 感染の新規診断時（急性感染症例を含む）
(2) 治療開始時
(3) 治療開始後十分な治療効果が認められない時
(4) 治療中薬剤耐性の出現が疑われた時
(5) ウイルス学的失敗以外の理由で薬剤を変更する時
(6) 治療の中断と再開時
(7) HIV 感染妊婦において予防投与を行う時

表 1.
プライマー一覧

Name	Sequence（5’ - 3’）	Location in HXB2＊	Orientation and usage	
DRPRO5	AGACAGGYTAATTTTTTAGGGA	2074 → 2095	PR/outer	forward
DRPRO2L	TATGGATTTTCAGGCCCAATTTTTGA	2716 → 2691	PR/outer	reverse
DRPRO1M	AGAGCCAACAGCCCCACCAG	2148 → 2167	PR/inner	forward
DRPRO6	ACTTTTGGGCCATCCATTCC	2611 → 2592	PR/inner	reverse
DRRT1L	ATGATAGGGGGAATTGGAGGTTT	2388 → 2410	RT/outer	forward
DRRT4L	TACTTCTGTTAGTGCTTTGGTTCC	3425 → 3402	RT/outer	reverse
DRRT7L	GACCTACACCTGTCAACATAATTGG	2485 → 2509	RT/inner	forward
DRRT6L	TAATCCCTGCATAAATCTGACTTGC	3372 → 3348	RT/inner	reverse
172A	ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG	625 → 649	Gag/outer	forward
173B	CTGATAATGCTGAAAACATGGGTAT	1318 → 1294	Gag/outer	reverse
174A	CTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCT	683 → 707	Gag/inner	forward
175B	CCCATGCATTCAAAGTTCTAGGTGA	1255 → 1231	Gag/inner	reverse
106A	CATACATTATTGTGCCCCGGCTGG	6866 → 6889	Env/outer	forward
17B	AGAAAAATTCCCCTCTACAATTAA	7374 → 7351	Env/outer	reverse
14A	AATGTCAGCTCAGTACAATGCACAC	6945 → 6969	Env/inner	forward
10B	ATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG	7336 → 7315	Env/inner	reverse
DRIN01	CAGACTCACAATATGCATTAGG	4039 → 4060	Integrase/outer	forward
DRIN02	CCTGTATGCAGACCCCAATATG	5264 → 5243	Integrase/outer	reverse
DRIN05	CTGGCATGGGTACCAGCACACAA	4146 → 4168	Integrase/inner	forward
DRIN04	TAGTGGGATGTGTACTTCTGAAC	5217 → 5195	Integrase/inner	reverse

*HXB2: Accession No. K0345

図1. プライマー結合部位 とPCR産物



参考文献

杉浦亙 (2002)
HIV-1の薬剤耐性検査と臨床的意義
日本臨床 60巻 703-710

Hirsch, M. S., F. Brun-Vezinet, R. T. D'Aquila, S. M. Hammer, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, C. Loveday, J. W. Mellors, B. Clotet, B. Conway, L. M. Demeter, S. Vella, D. M. Jacobsen, and D. D. Richman. (2000). Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. JAMA. 283, 2417-26.

Sugiura, W. (2001). Effect of introduction of highly active antiretroviral treatment and the changes in patterns of drug-resistant HIV-1 in Japan. J Infect Chemother. 7, 127-32.

７． 執筆者一覧

1.	はじめに	近藤真規子　巽　正志
2.	検査手順	近藤真規子　巽　正志
2.1.	HIV スクリーニング検査	近藤真規子　巽　正志
2.2.	追加スクリーニング検査（追加検査）	近藤真規子
2.3.	確認検査	近藤真規子　巽　正志
2.4.	HIV-2 の検査	近藤真規子
2.5.	BED アッセイ	貞升　健志
3.	病原体の検出法	
	ウイルス分離法（通常PBMC共培養法）	川畑　拓也
3.2	PBMC共培養によるHIV高効率分離法	近藤真規子
3.3	MAGIC-5A細胞と磁気粒子によるHIV分離法	巽　正志
4.	HIV ゲノムの増幅とサブタイプ・サブタイプ間組換体判定法	草川 茂　武部　豊
5.	HIV-1 RNA 定量法（KK-TaqMan 法）	近藤真規子
6.	HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法	杉浦　亙

連絡先

近藤真規子	神奈川県衛生研究所	kondo.dvqy@pref.kanagawa.jp
巽　正志	国立感染症研究所	tatsu@nih.go.jp
貞升　健志	東京都健康安全研究センター	Kenji_Sadamasu@member.metro.tokyo.jp
川畑　拓也	大阪府立公衆衛生研究所	kawahata@iph.pref.osaka.jp
草川　茂	国立感染症研究所	kusagawa@nih.go.jp
武部　豊	国立感染症研究所	takebe@nih.go.jp
杉浦　亙	名古屋医療センター	wsugiura@nnh.hosp.go.jp